

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Développement de résistances bactériennes suite à
l'administration d'enrofloxacin par voie orale,
intramusculaire et locale chez un modèle porcin**

Présenté par

Romain Béraud

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade

Maître ès sciences (M. Sc.)

en sciences vétérinaires

option sciences cliniques

Avril 2008

© Romain Béraud, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé

**Développement de résistances bactériennes suite à l'administration
d'enrofloxacin par voie orale, intramusculaire et locale chez un
modèle porcin**

présenté par

Romain Béraud

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Marie Archambault, présidente-rapporteuse

Louis M. Huneault, directeur de recherche

Jérôme del Castillo, codirecteur

Marc-André d'Anjou, membre du jury

RÉSUMÉ

Notre projet évaluait la sélection de résistances bactériennes chez des isolats d'*Escherichia coli* fécaux, un réservoir potentiel de gènes de résistance, durant une exposition prolongée à une fluoroquinolone (FQ) suite à l'implantation d'un système à libération locale maîtrisée (SLLM) ou une administration systémique chez un modèle porcin. Vingt-et-un porcs ont été aléatoirement répartis dans le groupe M (5 mg/kg/j d'enrofloxacin (EFX) intramusculaire), O (5 mg/kg/j d'EFX orale) ou L (implantation chirurgicale péri-fémorale de sept implants de poly méthacrylate de méthyle, contenant 65 mg d'EFX, pour 10 kg). Des prises de sang étaient réalisées quotidiennement pour caractériser la fluctuation des concentrations plasmatiques d'EFX et de son métabolite la ciprofloxacine (CFX). Des échantillons fécaux étaient prélevés quotidiennement pour déterminer les comptes d'*E. coli* ainsi que leur sensibilité vis-à-vis de plusieurs antibiotiques par la méthode de diffusion sur gélose. Dans les trois groupes, l'administration d'EFX a entraîné une diminution sous le seuil de détection des comptes bactériens après 2 jours. La période de bactéricidie a été significativement plus longue dans les groupes O (9.5 ± 2.18 jours) et M (8 ± 1.66 jours) que dans le groupe L (4.57 ± 0.72 jours). Durant la période de recolonisation bactérienne, la sensibilité à l'EFX, la CFX et l'acide nalidixique des *E. coli* dans le groupe L a légèrement mais significativement diminué ($p=0.05$), en restant cependant au dessus du seuil de sensibilité, alors qu'elle a diminué de manière très importante dans les groupes O et M ($p<0.0001$). De plus, l'exposition IM et PO à l'EFX a entraîné une diminution significative de la sensibilité des *E. coli* à l'ampicilline et au triméthoprime-sulfaméthoxazole. En conclusion, l'utilisation d'une modalité d'administration minimisant l'exposition de la flore intestinale à la FQ minimise également la sélection de souches bactériennes fécales résistantes. Ceci pourrait représenter un avantage supplémentaire des SLLM comparé à une administration systémique de FQ pour le traitement des ostéomyélites.

Mots-clés : antibiothérapie, résistance, fluoroquinolone, enrofloxacin, oral, intramusculaire, système à libération locale maîtrisée, ostéomyélite, porc.

SUMMARY

This study evaluated the selection of antibiotic resistance in fecal isolates of *Escherichia coli*, a potential reservoir of resistance genes, during prolonged exposure to a fluoroquinolone (FQ) after implantation of a local drug delivery system (LDDS) or systemic administration in a swine model. Twenty-one pigs were randomly assigned to group M (5 mg/kg/day of intramuscular enrofloxacin (EFX)), O (5 mg/kg/day of oral EFX) or L (surgical implantation of seven peri-femoral polymethyl-methacrylate implants, containing 65 mg of EFX, per 10 kg). Blood samples were collected daily for determination of plasma EFX concentrations and its metabolite ciprofloxacin (CFX) concentrations. Fecal samples were collected daily to determine the *E. coli* counts and their antimicrobial susceptibility patterns as evaluated by antibiotic disk diffusion tests. In all three groups, EFX administration significantly reduced the bacterial counts after 2 days. The bactericidal period lasted significantly longer in group O (9.5 ± 2.18 days) and M (8 ± 1.66 days) compared to L (4.57 ± 0.72 days). Susceptibility to EFX, CFX and nalidixic acid of recolonizing *E. coli* slightly decreased in L pigs but remained above the susceptibility breakpoint. In contrast, FQ susceptibility of recolonizing *E. coli* in M and O pigs dramatically dropped ($p < 0.0001$). In addition, M and O exposure to FQ significantly decreased the susceptibility of *E. coli* to ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole. In conclusion, the use of a dosing regimen that minimized the intestinal exposure of the fecal flora to the FQ also minimized the selection of resistance in the fecal reservoir. This could represent another advantage of LDDS usage compared to long-lasting systemic administration of FQ for the treatment of chronic osteomyelitis.

Keywords: antibiotherapy, resistance, fluoroquinolone, enrofloxacin, oral, intramuscular, local drug delivery system, osteomyelitis, swine.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Summary.....	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Dédicaces.....	xiv
Remerciements.....	xv
Introduction.....	1
Chapitre premier : RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	3
1. L'ostéomyélite post-traumatique	4
1.1. Caractéristiques générales de l'ostéomyélite post-traumatique.....	4
1.2. Pathophysiologie de l'ostéomyélite post-traumatique.....	5
1.2.1. Nature de l'agent infectieux.....	5
1.2.2. Facteurs de risque	5
1.2.3. Pathogénie.....	6
1.3. Diagnostic de l'ostéomyélite post-traumatique	7
1.3.1. Signes cliniques et imagerie médicale	8
1.3.2. Bactériologie et histopathologie	9
1.4. Prévention de l'ostéomyélite post-traumatique	9
1.5. Traitement de l'ostéomyélite post-traumatique	10
1.5.1. Aspect chirurgical.....	10
1.5.2. Aspect médical.....	11

2. Fluoroquinolones et antibiorésistance	12
2.1. Rappels pharmacologiques	12
2.1.1. Propriétés physicochimiques	12
2.1.2. Pharmacocinétique	13
2.1.3. Pharmacodynamie	14
2.1.4. Mode d'action et spectre d'activité	17
2.1.5. Indications cliniques chez les animaux de compagnie et effets indésirables	18
2.2. Mécanismes d'antibiorésistance	20
2.2.1. Mutations	20
2.2.2. Sélection d'un gène de résistance bactérienne	22
2.2.3. Dissémination du gène de résistance	22
2.2.4. Notion de « réservoir »	24
2.3. Observations cliniques	24
2.3.1. Chez les humains	24
2.3.2. Chez les animaux de rente	25
2.3.3. Chez les animaux de compagnie	26
3. Les Systèmes à Libération Locale Maîtrisée	28
3.1. Avantages	28
3.2. Caractéristiques	29
3.2.1. Implants – matrices	29
3.2.2. Antibiotique	32
3.3. Efficacité clinique	34
3.3.1. Rôle prophylactique	34
3.3.2. Rôle thérapeutique	35

3.4. Inconvénients	35
4. Objectifs et hypothèses de recherche	38
Chapitre deuxième : MÉTHODOLOGIE.....	39
1. Animaux et conditions de logement	40
2. Produits utilisés	40
3. Procédures et groupes de traitement	41
4. Méthodes d'évaluation	42
4.1. Suivi clinique	42
4.2. Pharmacocinétique.....	43
4.3. Bactériologie fécale et cutanée	43
5. Analyse statistique	44
Chapitre troisième : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....	46
Chapitre quatrième : AUTRES RÉSULTATS.....	56
1. Généralités.....	57

2. Concentrations plasmatiques en enrofloxacin et ciprofloxacine	57
3. Comptages bactériens d'<i>E. coli</i> fécaux	59
4. Sensibilité et résistance des bactéries <i>E. coli</i>	60
Chapitre cinquième : DISCUSSION ET CONCLUSION.....	64
1. Discussion	64
1.1. Validité de nos voies d'administrations et de nos marqueurs.....	64
1.1.1. Variations des concentrations plasmatiques en enrofloxacin et en ciprofloxacine.....	64
1.1.2. <i>Escherichia coli</i> comme indicateur bactériologique et contrôle des variables.....	65
1.2. Effet de l'implantation de notre système à libération locale maîtrisée sur la flore fécale.....	66
1.3. Effet de l'administration systémique d'enrofloxacin sur la flore fécale.....	68
1.4. Développement de résistances croisées	70
1.5. Avantages et inconvénients des systèmes à libération locale maîtrisée	71
1.6. Limites de notre étude.....	72
1.7. Voies futures	74
2. Conclusion	75

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre premier :

Tableau I : Système de classification des ostéomyélites selon Cierny et Mader. 4

Tableau II : Principales études comparant les taux d'infection lors d'administration systémique d'antibiotique ou de mise en place d'un système à libération locale maîtrisée. 34

Chapitre deuxième :

Tableau III : Présentations des différents antibiotiques testés par antibiogramme dans notre étude. 44

Chapitre quatrième :

Tableau IV : Paramètres pharmacocinétiques de l'enrofloxaciné et de la ciprofloxacine des groupes O, M et L. 59

LISTE DES FIGURES

Chapitre premier :

- Figure 1** : Formation d'un biofilm en surface d'un implant chirurgical..... 7
- Figure 2** : Structure des principales fluoroquinolones utilisées en médecine vétérinaire..... 12
- Figure 3** : Effet des concentrations en fluoroquinolone sur la sélection de souches résistantes de *Mycobacterium bovis* BCG et schématisation pharmacocinétique de la fenêtre de sélection des mutants. 16
- Figure 4** : Activité antibactérienne des fluoroquinolones en relation avec leur structure moléculaire..... 17
- Figure 5** : Effets secondaires des fluoroquinolones en relation avec leur structure moléculaire. 19
- Figure 6** : Diagramme exposant les échanges connus de gène de résistance aux antibiotiques entre bactéries dans la nature. 23
- Figure 7** : Présentations commerciales du poly méthacrylate de méthyle. 30

Chapitre deuxième :

- Figure 8** : Échantillon de nos implants de polyméthacrylate de méthyle contenant de l'enrofloxacin. 41

Chapitre quatrième :

- Figure 9** : Courbes des concentrations plasmatiques moyennes en enrofloxacin obtenues dans les groupes L, M et O..... 58
- Figure 10** : Courbes des concentrations plasmatiques moyennes en ciprofloxacine obtenues dans les groupes L, M et O..... 58
- Figure 11** : Comptages bactériens d'*E. coli* fécaux obtenus dans les groupes L, M et O..... 60
- Figure 12** : Sensibilités à l'enrofloxacin obtenues dans les groupes L, M et O..... 61
- Figure 13** : Sensibilités à l'amoxicilline obtenues dans les groupes L, M et O..... 61
- Figure 14** : Sensibilités à l'ampicilline obtenues dans les groupes L, M et O..... 62
- Figure 15** : Sensibilités au sulfamide/triméthoprim obtenues dans les groupes L, M et O..... 62

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AMO : ablation du matériel d'ostéosynthèse

AUC₂₄ : *area under the curve for 24 hours*, aire sous la courbe pour 24 heures

AUMC : *area under the first moment curve*, aire sous la courbe du premier moment

CFU : *colony forming units*, unité formant une colonie

CMI : concentration minimale inhibitrice

C_{max} : concentration sérique maximale

CPM : concentration de prévention des mutants

EFX : enrofloxacin

FDA : *food and drug administration*

FSM : fenêtre de sélection des mutants

FQ : fluoroquinolone(s)

g : gramme

IM : intramusculaire

IRM : imagerie par résonance magnétique

IV : intraveineuse

kD : kilodalton

kg : kilogramme

L : litre

LDDS : *local drug delivery system*, système à libération locale maîtrisée

mL : millilitre

OMPT : ostéomyélite post-traumatique

OMS : organisation mondiale de la santé

PGA : *poly(glactic acid)*, poly(acide glycolique)

PGLA : *poly(glycolides-co-lactides acid)*, poly(acide lactique-co-glycolique)

PLA : *poly(lactic acid)*, poly(acide lactique)

PMMA : *polymethyl methacrylate*, polyméthacrylate de méthyle

PO : *per os*

PBP : *penicillin binding protein*, protéine liant les pénicillines

QRDR : *quinolone resistance determining region*, région déterminant la résistance aux fluoroquinolones

SLLM : système à libération locale maîtrisée

µg : microgramme

°C : degré Celsius

% : pour cent

DÉDICACES

A ma blonde (!), ma très chère petite Marion, qui a enduré mes discussions de « cochons » pendant tout ce temps sans se lasser, qui a su m'apaiser à certains moments et me remotiver à d'autres. Je tacherai de faire de même quand ton tour viendra !

A ma mère et mon père

A mon frère et ma sœur

REMERCIEMENTS

Au Dr Louis Huneault, mon directeur de maîtrise et de DES, mon mentor et ami, pour tout ce qu'il m'a apporté.

Au Dr Jérôme del Castillo, mon co-directeur de maîtrise, pour son aide dans la réalisation des analyses pharmacologiques et statistiques.

A Marianne Turgeon-Plouffe, très précieuse étudiante engagée, pour son aide inestimable, sa compétence, sa motivation et sa bonne humeur inaltérable.

A Dave Bernier, un peu mon co-étudiant à la maîtrise (!), pour sa patience à toute épreuve et son aide inestimable dans la gestion des nombreux « contre-temps ».

Au personnel du LHVA, René et Elena, pour leur aide très précieuse.

Au personnel du complexe de Bio-Évaluation de la FMV, pour leur gentillesse, leur disponibilité et leurs conseils.

A Francis Beaudry, pour sa disponibilité dans la réalisation des analyses pharmacocinétiques.

A Ann Letellier, Valérie Normand et Stéphanie St-Jean pour leur aide et leurs précieux conseils en bactériologie.

A Guy Beauchamp, pour son aide dans la réalisation des analyses statistiques.

Et à mes 21 petits cochons, sans qui je n'aurais rien pu faire.....

INTRODUCTION

L'antibiorésistance est un sujet d'actualité avec des implications très importantes, tant au niveau des milieux hospitaliers humains et vétérinaires que dans le domaine de l'agro-alimentaire. Depuis leur commercialisation dans les années 1980, les fluoroquinolones (FQ) ont rapidement acquis une importante popularité due à leurs caractéristiques pharmacocinétiques favorables, et elles représentent actuellement 11. % de toutes les prescriptions d'antibiotiques en médecine humaine [123]. Néanmoins, depuis quelques années, la communauté scientifique se penche sur les conséquences de l'utilisation des FQ en médecine humaine et vétérinaire en raison de l'émergence rapide et importante de bactéries résistantes. Il a en effet été démontré que l'administration excessive voire inappropriée d'antibiotiques avait un impact majeur sur la sélection de bactéries résistantes au niveau de la flore pathogène, mais également au niveau de la flore commensale qui constitue un réservoir bien plus important [62, 96, 142, 143]. Cette exposition bactérienne aux antibiotiques peut aussi être exacerbée par les voies d'élimination spécifiques de l'antibiotique. Des études ont ainsi mis en évidence une élimination significative des FQ par les intestins, via les glycoprotéines P, en plus de leur métabolisme classique hépatique et rénal [103, 106, 144]. Ceci augmenterait alors l'exposition de la flore commensale fécale.

Afin de limiter la progression de ces antibiorésistances émergentes en médecine humaine ou vétérinaire, diverses mesures ont été prises pour, d'une part, réduire la consommation d'antibiotiques et, d'autre part, rendre leur utilisation plus raisonnée. L'usage controversé d'antibiotiques en prophylaxie et/ou comme promoteurs de croissance, notamment dans les élevages porcins et aviaires, a ainsi été fortement restreint, voire interdit comme en Europe depuis 2006. De nombreux organismes (Organisation Mondiale de la Santé, American Animal Hospital Association, American College of Veterinary Internal Medicine, etc.) ont également édité des recommandations pour un usage raisonné des antibiotiques en médecine des animaux de compagnie [82, 121, 142]. Cependant, et de manière étonnante, très peu de données sont disponibles actuellement concernant le potentiel de sélection de bactéries antibiorésistantes par différents schémas thérapeutiques (voies d'administration), ce qui est une étape-clé pour un

usage rationnel des antibiotiques chez les animaux de compagnie, de consommation et chez l'homme.

En médecine humaine comme dans le milieu vétérinaire, l'ostéomyélite post-traumatique (OMPT) peut représenter un défi thérapeutique étant donné la faible pénétration des antibiotiques systémiques au niveau des tissus dévascularisés et des biofilms présents au site d'infection [60, 116]. Les conséquences d'un échec au traitement peuvent être considérablement débilitantes pour un patient. L'approche thérapeutique classique consistait en un débridement chirurgical agressif, le retrait ou le remplacement des implants sans diminuer la stabilité osseuse [71, 72, 120] et une antibiothérapie systémique de longue durée [59, 72], avec des taux de succès entre 80 et 90% [15, 72]. Pour améliorer ces taux de succès, des systèmes à libération locale maîtrisée (SLLM) ont été développés, permettant d'atteindre des concentrations d'antibiotiques extrêmement élevées au site d'infection, de manière relativement soutenue dans le temps, tout en minimisant les risques de toxicité systémique [51, 60, 116]. Ils sont également utilisés en mode préventif, par exemple dans le traitement de fractures ouvertes. Étant donné un certain passage dans le sang des antibiotiques libérés localement [4, 51, 116], il est possible que l'exposition systémique produite (sous la concentration minimale inhibitrice de nombreuses bactéries pendant une longue période de temps) favorise la sélection de résistance bactérienne dans les flores normales de l'hôte. Par contre, les taux sériques étant très bas (10 à 100 fois inférieurs à la concentration minimale inhibitrice (CMI) de nombreuses bactéries), il est aussi possible qu'aucun phénomène de résistance ne soit engendré [4, 51, 116]. Malgré le nombre grandissant de rapports de bactéries pathogènes résistantes suite à l'utilisation de SLLM [108, 117, 127, 136], peu d'informations sont disponibles quant à leur rôle potentiel dans la sélection de résistances au niveau de la flore commensale.

L'objectif de cette étude était de comparer le développement de résistances bactériennes au niveau de la flore fécale, et plus particulièrement *Escherichia coli*, chez un modèle porcin suite à l'administration orale, intramusculaire et locale (par implantation d'un SLLM) d'enrofloxacin (EFX). Les résultats de cette étude nous permettraient alors d'évaluer plus précisément le ratio bénéfice/risque de chacune des trois voies d'administration d'antibiotiques.

Chapitre premier

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1. L'ostéomyélite post-traumatique

Par définition, l'ostéomyélite est une inflammation de l'os (moelle osseuse, cortex et éventuellement périoste) causée par un agent infectieux. De nombreuses classifications existent, basées sur la durée d'évolution du processus (aiguë/chronique), son étendue (diffuse/localisée), son origine (hématogène, par contiguïté, post-traumatique). La classification établie par Cierny et Mader en médecine humaine semble être la plus complète : elle prend en compte le type anatomique d'ostéomyélite et la classe physiologique du patient et permet d'associer un protocole thérapeutique à chaque stade (**Tableau I**) [71]. Les ostéomyélites de stade 3 et 4, encore fréquemment regroupées sous le terme d'ostéomyélite post-traumatique (OMPT), sont concernées par ce sujet de maîtrise.

Tableau I : Système de classification des ostéomyélites selon Cierny et Mader.

Classification	Description
Type anatomique	
Stade 1	Ostéomyélite médullaire
Stade 2	Ostéomyélite superficielle
Stade 3	Ostéomyélite localisée
Stade 4	Ostéomyélite diffuse
Type physiologique	
Hôte A	Bon état de santé général
Hôte B	<u>Bs</u> : compromis systémique (malnutrition, insuffisance rénale ou hépatique, diabète sucré, hypoxie chronique, maladie auto-immune, immunodépression ou déficience immunitaire, âge levé) <u>Bl</u> : compromis local (lymphoedème chronique, stase veineuse, compromis de vaisseau sanguin majeur, artérite, cicatrisation extensive, fibrose de radiation, neuropathie) <u>Bls</u> : compromis systémique et local
Hôte C	Traitement pire que la maladie

(D'après [71]).

1.1. Caractéristiques générales de l'ostéomyélite post-traumatique

L'OMPT correspond au type d'ostéomyélite le plus fréquemment rencontré en médecine humaine et vétérinaire [126]. Elle survient classiquement à la suite d'un traumatisme osseux

chirurgical ou accidentel (réductions ouvertes de fracture, fractures par balle ou suite à un accident de la voie publique, morsures de l'avant-bras, mise en place de prothèse totale de hanche, etc.). Ceci est d'ailleurs corrélé à une atteinte majoritaire du squelette appendiculaire (90 % des OMPT) et à une prédisposition des mâles, les deux étant souvent impliqués dans des fractures [18]. Contrairement à l'ostéomyélite hématogène, l'OMPT n'est pas une affection systémique et le processus reste généralement localisé à (aux) l'os traumatisé(s) [15]. Exception faite des segments osseux distaux (métacarpes, métatarses et phalanges), l'OMPT implique dans la majorité des cas un seul os [18].

1.2. Pathophysiologie de l'ostéomyélite post-traumatique

1.2.1. Nature de l'agent infectieux

La grande majorité des ostéomyélites est d'origine bactérienne, même si de rares cas d'ostéomyélite virale ou mycosique ont été rapportés [59]. L'OMPT résulte dans la majorité des cas d'une infection monobactérienne : un seul micro-organisme bactérien est en effet isolé dans 53 % des cas d'OMPT, deux organismes dans 31 % et trois dans 15 % des cas [15]. Les agents principaux sont les *Saphylococcus intermedius* et *Saphylococcus aureus*, retrouvés dans 45 à 61 % des cas [15, 59, 71]. Les *Streptococcus* spp. et des bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. et *Klebsiella* spp.) sont aussi rencontrées [15, 59]. Enfin, les agents anaérobies facultatifs ou obligatoires (*Actinomyces* spp., *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp. et *Bacteroides* spp) sont rares lors d'infection simple (un seul agent causal) mais sont présents dans près de 70 % des OMPT polymicrobiennes [59].

1.2.2. Facteurs de risque

La seule présence d'un agent bactérien n'est pas suffisante pour entraîner le développement d'une OMPT. De 60 à 70 % des fractures ouvertes chez l'homme sont contaminées par des

bactéries, alors qu'un pourcentage bien plus faible développe une infection [126]. Trois éléments concomitants sont en fait nécessaires :

- Une plaie infectée : elle se définit comme une plaie contaminée par un agent bactérien présent en nombre suffisant ($> 10^5$ CFU) et ayant bénéficié d'un temps suffisant pour lui permettre de se multiplier. Cette contamination est principalement due une mauvaise technique opératoire et moins fréquemment à une contamination environnementale (fracture ouverte, etc.) [15, 110] ;
- Un corps étranger (séquestre osseux, implant orthopédique) isolé des mécanismes de défense de l'hôte et de la diffusion des antibiotiques [15, 59, 71, 126] ;
- Un environnement favorable à la croissance bactérienne: la plupart des bactéries peuvent subsister en présence d'un environnement non optimal mais nécessitent des conditions favorables pour se multiplier. Celles-ci peuvent être représentées par la présence d'hématomes, de tissus nécrosés ou fibrosés ou d'un foyer de fracture instable.

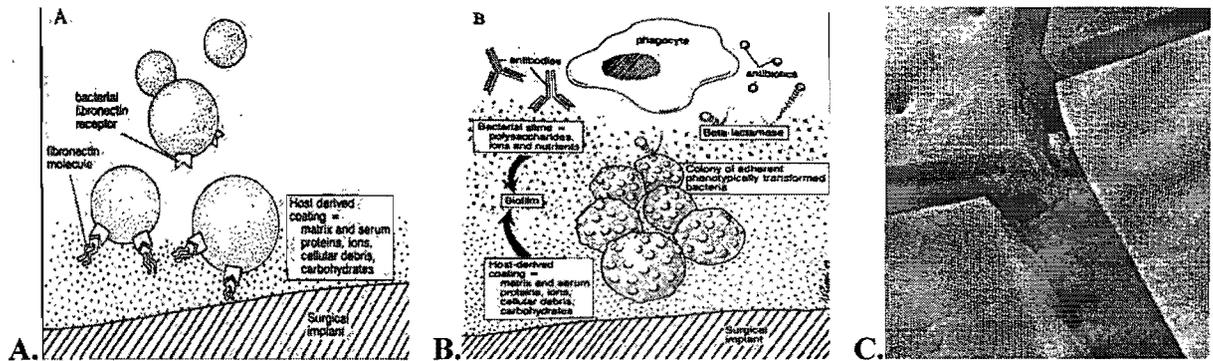
1.2.3. Pathogénie

Après la contamination d'une plaie, les bactéries responsables d'une infection doivent adhérer aux tissus de l'hôte pour proliférer. Ceci est rendu possible par l'exposition du collagène et de fibronectine à la surface des tissus traumatisés car certaines bactéries (notamment *S. aureus*) possèdent des récepteurs à ces protéines [21, 126].

La présence de corps étrangers (implants orthopédiques, tissus mous et osseux avasculaires) favorise également l'adhésion des bactéries car ils sont rapidement recouverts d'une matrice composée de protéines sériques, de fibronectine, de laminine et d'autres protéines. Les bactéries adhèrent à cette matrice et certaines d'entre elles, notamment les staphylocoques ont la capacité à produire un limon composé d'exopolysaccharides, d'ions et d'autres nutriments, l'ensemble formant un biofilm ou glycocalyx (**Figure 1**) [126]. Ce biofilm est composé de deux populations : une planctonique qui est active en surface du biofilm et une sessile qui est ancrée dans l'épaisseur du biofilm, à l'origine des infections chroniques [110]. La présence de ce biofilm (1) protège les bactéries en les isolant du système immunitaire de l'hôte et de la diffusion des antibiotiques, (2) peut entraîner un ralentissement de leur métabolisme à l'origine d'une tolérance accrue vis-à-vis de l'action des antibiotiques, (3) permet le phénomène de variation de phase (groupe de mécanismes génétiques où l'expression d'un gène varie rapidement de façon

réversible de génération en génération), (4) favorise le développement de bactéries dites « persisters » [8, 21, 67, 126]. L'impact du biofilm est tellement important que des études commencent à évoquer l'intérêt d'établir, en laboratoire, les concentrations minimales d'éradication dans le biofilm au lieu des CMI [50, 93].

Figure 1 : Formation d'un biofilm en surface d'un implant chirurgical.



(A) adhérence bactérienne ; (B) dépôt du limon bactérien ; (C) Staphylococci visualisés dans un biofilm au microscope électronique. (D'après [59,86]).

L'hôte réagit à cette infection par une réponse inflammatoire aigüe caractérisée par une vasodilatation locale, un œdème tissulaire, une diapédèse des leucocytes (polynucléaires, macrophages), etc. [126]. Après cette phase aigüe, un phénomène inflammatoire chronique débute et mène à la formation d'une capsule et d'un abcès chronique qui inclue, le cas échéant, le(s) séquestre(s) infecté(s). L'accumulation progressive d'exsudat purulent entraîne une augmentation de pression locale et favorise la pénétration et la propagation de cet exsudat à travers les canaux haversiens ou de Volkmann de la trame osseuse.

1.3. Diagnostic de l'ostéomyélite post-traumatique

Aucune méthode diagnostique n'est assez sensible pour permettre à elle seule d'identifier une ostéomyélite. Le diagnostic est établi à partir de différentes données qui incluent l'interprétation du clinicien.

1.3.1. Signes cliniques et imagerie médicale

Les signes cliniques varient en fonction du stade du processus, mais restent généralement locaux, d'apparition lente : érythème, gonflement des tissus mous persistant plusieurs semaines après le traumatisme initial, douleur à la palpation, boiterie, atrophie, fibrose et contracture musculaire. La présence de trajets fistulaires se refermant et se réactivant de manière cyclique suite à l'arrêt du traitement est le signe clinique le plus fréquemment observé ou rapporté [15, 59]. Des signes systémiques tels que léthargie, fièvre, anorexie sont davantage caractéristiques d'une OMPT en phase aiguë.

La radiographie présente une sensibilité et une spécificité moyennes (62,5 et 57,1 % respectivement) [14]. Les modifications radiographiques classiquement observées sont une lyse osseuse, une réaction périostée plus ou moins spiculée et un gonflement des tissus mous. La présence d'un séquestre (*involucra*) et d'os sain entourant le séquestre (*involucrum*) est caractéristique mais rarement visualisée. Suite à une ostéosynthèse, une non-union, un retard de consolidation osseuse ou une lyse osseuse autour des implants orthopédiques (généralement, les vis et les broches) peuvent également être des signes en faveur d'une OMPT. Les signes radiographiques osseux reflètent néanmoins l'état de l'ostéomyélite avec un retard de 2 à 3 semaines [15]. Ils sont parfois difficiles à interpréter car ils peuvent mimer une guérison osseuse normale [71]. Des radiographies de contrôle peuvent alors être réalisées à quelques semaines d'intervalle afin de juger de l'évolution du processus. Lorsqu'un trajet fistulaire est présent, une fistulographie apporte souvent de précieuses informations pour la planification du débridement chirurgical qui doit idéalement inclure l'excision de ce trajet.

Le recours à des modalités d'imagerie alternative est nécessaire lorsque le diagnostic d'OMPT est incertain. La scintigraphie, notamment avec le méthylidiphosphonate de technétium 99m, bien que très peu spécifique, peut s'avérer intéressante en confirmant la présence d'une zone d'activité métabolique anormalement élevée [71]. La tomodensitométrie peut permettre de visualiser la présence de séquestres et de foyers plus denses/intenses au niveau de la moelle osseuse, qui correspondent à un signe précoce d'ostéomyélite. La tomodensitométrie est également intéressante dans la détermination de l'extension du processus aux tissus adjacents et la planification préopératoire dans les cas difficile [71]. Enfin, l'imagerie par résonance

magnétique (IRM) s'est avérée une modalité diagnostique très utile en médecine humaine. Sa résolution spatiale permet une évaluation précise de l'extension du processus infection ainsi que la distinction entre une ostéomyélite et une infection des tissus mous environnants (cellulite) [71]. L'apparence typique d'une OMPT est une zone localisée de moëlle anormale avec une hypo-intensité en T1 et une hyper-intensité en T2.

1.3.2. Bactériologie et histopathologie

La culture bactérienne est la technique la plus sensible, la rendant indispensable pour diagnostiquer et traiter une ostéomyélite [15,59]. L'administration d'antibiotiques doit être arrêtée pendant les 24 à 48 heures précédant le prélèvement [71]. Celui-ci est réalisé au niveau du site d'ostéomyélite, les zones plus superficielles (trajets fistulaires) étant fréquemment contaminées par des organismes opportunistes [21]. Des tissus nécrotiques, séquestres ou le matériel retiré forment d'excellents échantillons. Les prélèvements doivent être traités de manière adéquate (milieux aérobie, anaérobie et bouillon d'enrichissement). Un antibiogramme est ensuite réalisé.

L'histopathologie (identification de bactéries au niveau de l'os ou de la cavité médullaire) est une technique très spécifique (86,3 %) mais peu utilisée car invasive et peu sensible (33,3 %, donc risque élevé de faux négatifs) [14]. Des prélèvements peuvent néanmoins être facilement réalisés lors du débridement chirurgical (séquestre, tissu nécrotique, etc.) et alors être analysés.

1.4. Prévention de l'ostéomyélite post-traumatique

Le traitement d'une ostéomyélite peut s'avérer extrêmement difficile, long, coûteux et d'issue incertaine. L'accent doit donc être mis sur la prévention de cette affection. L'objectif est d'éviter l'occurrence des trois facteurs de risque mentionnés précédemment. La contamination d'une plaie et la création d'un milieu favorable au développement bactérien entrent en jeu lors d'une intervention chirurgicale ou en présence d'une plaie. Une gestion de plaie rigoureuse et une technique chirurgicale éprouvée sont nécessaires. Elles incluent : (1) une asepsie rigoureuse, (2) une antibio-prophylaxie adéquate, (3) des incisions nettes, (4) une hémostase soignée, (4) une manipulation des tissus précautionneuse et la plus atraumatique possible, (5) le retrait des corps

étrangers, des tissus fibrosés et nécrosés, (6) des décisions per-opératoires judicieuses (retirer un fragment osseux dévascularisé pour éviter tout risque d'infection ou le garder afin de stabiliser la réparation osseuse), (7) une stabilisation ferme des segments osseux impliqués et (8) une fermeture anatomique en limitant les espaces morts. La mise en place de système à libération locale maîtrisée (SLLM) d'antibiotique présente une efficacité prophylactique prouvée [58, 124, 137]. Elle peut être une excellente option lors de situations à risque (ex : fracture ouverte de type II ou III) ou lorsque la survenue d'une infection serait catastrophique (ex : prothèse totale de hanche) [58, 124, 137].

1.5. Traitement de l'ostéomyélite post-traumatique

Le but est d'améliorer l'environnement du site infecté pour augmenter son exposition au système immunitaire et aux antibiotiques administrés. Il comprend deux volets indissociables.

1.5.1. Aspect chirurgical

La première étape consiste en un débridement agressif qui doit être réalisé en apportant un soin particulier à la technique opératoire. La qualité du débridement est en effet le facteur le plus important dans le traitement de l'OMPT [71, 72, 120]. Tous les tissus mous et osseux nécrosés ou fibrosés, le matériel purulent, les fistules et les séquestres doivent être retirés. La viabilité du tissu osseux peut être évaluée subjectivement par la présence de saignements ponctiformes, appelé signe du paprika. Une exploration complète de la plaie et des prélèvements pour culture bactérienne doivent être réalisés, pendant ou après le débridement. L'antibiothérapie systémique peut alors être initiée. Le site chirurgical est ensuite abondamment rincé (1 à 5 L de soluté) à l'aide de saline physiologique ou d'une solution à 0,05 % de chlorhexidine tiède, sous faible pression. Lorsque le débridement entraîne une perte de plus de 30 % du volume cortical original, une stabilisation osseuse, généralement à l'aide d'une fixation externe, est recommandée afin d'éviter d'éventuelles fractures iatrogéniques [120]. Une greffe d'os spongieux peut être déposée au niveau du déficit osseux pour accélérer la guérison. Lorsqu'une fracture est impliquée dans le processus d'ostéomyélite, sa stabilité doit être vérifiée et fréquemment réévaluée. Si les implants sont stables, ils peuvent être laissés en place : une

fracture peut en effet guérir en présence d'une infection si la condition de stabilité est remplie [15]. Néanmoins, les implants permettant la persistance des agents infectieux, une ablation du matériel d'ostéosynthèse (AMO) est à prévoir après guérison osseuse complète [21, 110]. Si la fracture et/ou les implants sont instables, une AMO doit être réalisée et la fracture stabilisée à nouveau de manière adéquate (fixation externe linéaire, circulaire ou hybride). L'instabilité du foyer de fracture entraîne en effet des micromouvements continus qui entravent la revascularisation de l'extrémité des bouts osseux et crée un environnement favorable à la persistance de l'ostéomyélite [126]. Dans la mesure du possible, le site opératoire sera refermé par première intention, éventuellement à l'aide de lambeaux ou de greffes myo-cutanées, afin de permettre un recouvrement du site et d'améliorer sa vascularisation. Lorsque cela est irréalisable, la plaie chirurgicale est laissée ouverte et une cicatrisation par seconde intention est favorisée à l'aide de pansements adaptés.

1.5.2. Aspect médical

Le traitement médical consiste en une antibiothérapie systémique ciblée et soutenue. Elle ne peut en aucun cas se substituer au débridement chirurgical, sous peine d'échec ou de récives fréquentes. Le choix de l'antibiotique est principalement dicté par la sensibilité de la ou des bactérie(s) impliquée(s), déterminé par les résultats des cultures bactériennes et de l'antibiogramme. Avant d'obtenir les résultats ou si ceux-ci s'avèrent négatifs, un antibiotique est choisi de façon empirique en se basant sur les micro-organismes les plus fréquemment rencontrés. L'antibiotique utilisé doit également présenter une bonne diffusion au travers des tissus osseux sains et infectés, être bactéricide, présenter peu ou pas d'effets secondaires et être facile à administrer. Pour ces raisons, les pénicillines, les céphalosporines, les aminoglycosides, les FQ et parfois les tétracyclines sont les principales molécules utilisées [72]. En effet, ces antibiotiques présentent une très bonne pénétration osseuse [59]. Une durée de traitement minimale de 4 à 6 semaines est recommandée [59, 72, 105].

Malgré une approche conventionnelle rigoureuse, le taux de réussite varie de 80 à 90 % avec l'observation de nombreux cas de récives et de cas réfractaires à un traitement classique [15, 59, 71, 120]. De plus, le caractère prolongé du traitement antibiotique systémique de l'OMPT pose le problème de la sélection de souches bactériennes résistantes.

2. Fluoroquinolones et antibiorésistance

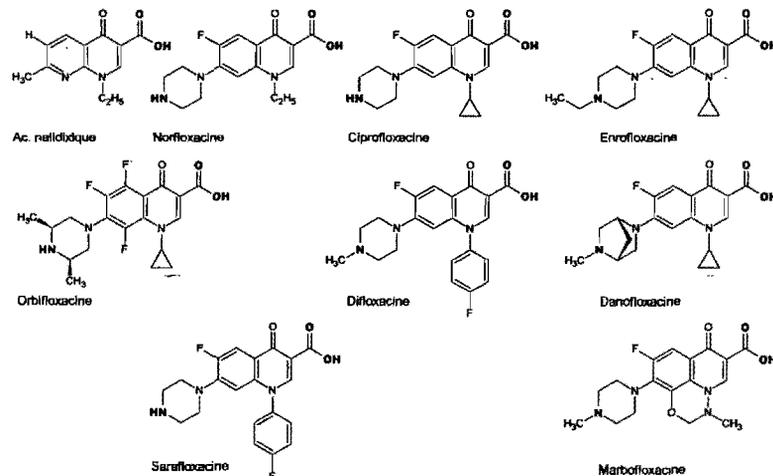
2.1. Rappels pharmacologiques

2.1.1. Propriétés physicochimiques

Les FQ sont des composés totalement synthétiques. La première quinolone commercialisée fut l'acide nalidixique dans les années 1960. Des modifications de sa structure permirent d'augmenter son spectre d'activité, à l'origine de quatre générations de FQ.

Les FQ sont amphotériques car elles présentent deux groupes ionisables : un groupe acide (acide carboxylique) et un groupe basique (amine tertiaire) (**Figure 2**) [77].

Figure 2 : Structure chimique des principales fluoroquinolones utilisées en médecine vétérinaire.



Les groupements ionisables sont en bleu (amine tertiaire) ou rouge (acide carboxylique).

Leurs valeurs de pKa varient entre 5,2 et 9,3 [35, 77]. Lorsque la valeur de pH du milieu est inférieure au pKa₁, les FQ ont une charge nette positive. Cette valeur inférieure de pKa détermine la fourchette de pH du milieu dans lequel les FQ sont solubles dans l'eau. Malgré quelques exceptions, les FQ sont ainsi faiblement solubles dans l'eau à pH entre 6 et 8. À pH entre pKa₁ et pKa₂, les FQ ont une charge nette neutre (zwitterion). Elles peuvent alors diffuser librement au travers des membranes biologiques mais sont très peu solubles dans les liquides

aqueux. À pH supérieur au pKa₂, les FQ présentent une charge nette négative. Ainsi, l'EFX présente une solubilité maximale dans l'eau à un pH de 5,02 et une solubilité aqueuse faible à pH entre 6 et 8. Cependant, c'est à l'intérieur de cette fourchette que l'EFX présente sa solubilité lipidique et donc une facilité de diffusion au travers des membranes biologiques (dont celles bactériennes) maximales. Le point isoélectrique de la plupart des FQ se situe entre des valeurs de pH de 6,4 et 7,5 [94]. Cet élément explique la richesse du « zwitterion » au pH intestinal et la formation de complexes peu solubles avec des cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) à des valeurs de pH s'approchant de la neutralité (le groupement azoté devient non-ionisé et le groupement carboxylique s'ionise, ce qui lui permet d'établir des liens de coordination avec les cations, à l'aide du groupement carbonyle situé sur le carbone β).

Le transfert maximal de l'EFX d'une phase aqueuse à lipidique (coefficient de partage octanol-eau) intervient à un pH de 7. Le degré de lipophilie des différentes FQ varie de faible (CFX, enoxacine, etc.) à élevé (pefloxacine, ofloxacine, etc.) [33]. La solubilité intrinsèque de l'EFX et de la ciprofloxacine (CFX) est respectivement de 0.416 mg/mL et 0.132 mg/mL [38]. Le coefficient de partage de l'EFX et de la CFX est respectivement de 2.37 et 0.035 [38]. Le poids moléculaire de l'EFX et de la CFX est respectivement de 360,15 et 331,35 kD [38].

2.1.2. Pharmacocinétique

Les caractéristiques pharmacocinétiques varient de manière importante selon la FQ impliquée et l'espèce animale concernée [77]. Les FQ présentent une absorption, par voie entérale ou parentérale, de plus de 80 % [35, 128, 135]. Cette particularité a notamment permis le traitement *per os* d'affections requérant habituellement une thérapie parentérale prolongée. L'absorption est peu affectée par l'administration concomitante d'un repas mais s'avère réduite en présence de cations multivalents chélatant le groupe céto-énol (Ca^{2+} , Al^{3+} , Mg^{2+} , etc. fréquemment retrouvés dans les anti-acides et les produits laitiers) [35, 128]. Le pic plasmatique est atteint en 1 à 2 heures après administration [128, 135]. Les FQ sont liées de manière variable aux protéines plasmatiques (10 à 60 %) et leur demi-vie plasmatique est moyenne (4 à 10 heures) [128, 135]. Elles présentent un large volume de distribution (plus de 1,5 L/kg) et une très bonne pénétration dans les tissus et le cytoplasme cellulaire [128, 135]. Les concentrations dans les tissus rénal, hépatique, génital et trachéobronchique sont, par exemple, trois à cinq fois celles sériques [35, 135]. Les FQ diffusent également très largement dans la peau et les os.

La voie d'élimination principale des FQ peut être rénale, par sécrétion tubulaire et filtration glomérulaire et/ou via le métabolisme hépatique [35, 77, 135]. L'administration concomitante de probénécide, qui est un inhibiteur des transporteurs d'anions organiques, diminue d'ailleurs la clairance rénale des FQ [77, 135]. Les voies métaboliques des FQ incluent la glucuronidation (grepafloxacin, sparfloxacin, moxifloxacin, etc.), et la N-oxidation et la déméthylation (levofloxacin et sparfloxacin). Le métabolite principal de l'EFX est la CFX. Généralement, leur métabolisme implique certaines isoenzymes du complexe cytochrome P-450 [77]. D'autres voies d'élimination ont également été rapportées : excrétion biliaire mise en évidence chez l'homme et le chien [77], excrétion sudorifique mise en évidence chez l'homme et le porc [52] et excrétion intestinale transépithéliale mise en évidence chez le rat et le lapin (1 à 19 %) [103, 106]. De récentes études ont en effet démontré le rôle des glycoprotéines P au niveau des cellules Caco-2 dans la sécrétion active du sang à la lumière intestinale par des transporteurs pour plusieurs FQ [83, 144]. Il a également été mis en évidence l'implication de transporteurs anion sensible [77, 83]. Ces mécanismes seraient à l'origine, d'une part, de l'élimination des FQ présentes au niveau sanguin et d'autre part, d'un effet de barrière à l'absorption des FQ présentes au niveau intestinal diminuant ainsi leur biodisponibilité lors d'administration orale. Par exemple, lors d'administration intraveineuse de grepafloxacin ou de levofloxacin, l'administration simultanée de cyclosporine A, un inhibiteur des glycoprotéines P, a entraîné une diminution significative de 60 et 63% de la clairance et du volume de distribution, respectivement, comparativement aux valeurs témoins (analyse par modèle compartimental). Lors d'administration intra-intestinale de ces FQ, la clairance systémique était diminuée de 33% et la biodisponibilité orale était augmentée de 95% lors d'administration de cyclosporine A comparativement aux valeurs témoins [144]. De plus, étant donné leur métabolisme hépatique impliquant le cytochrome P450, les FQ peuvent diminuer l'élimination hépatique de certaines drogues tel que la théophylline, les barbituriques, le chloramphénicol, le rifampin et les antibiotiques ionophores entraînant de potentiels surdosages [33, 77, 135].

2.1.3. Pharmacodynamie

Les FQ présentent une action bactéricide « concentration dépendante ». Les courbes de survie montrent en effet que, lorsque la concentration en FQ est proche de la CMI de la bactérie

(ratio 1 :1), un effet bactériostatique est observé. Quand la concentration en FQ augmente par rapport à la CMI, l'effet bactéricide augmente également jusqu'à une certaine concentration, appelée concentration bactéricide optimale (ratio 10 :1). Au-delà de cette concentration (ratio 15 :1 à 20 :1), l'effet bactéricide atteint un plateau et peut même diminuer (ratio supérieur à 20 :1) [35, 77, 135]. Les FQ sont également caractérisées par un effet post-antibiotique (temps nécessaire à une population bactérienne pour redémarrer sa croissance après avoir été exposée à un antibiotique) modéré à important (1,5 à 3 heures) [26, 128, 135].

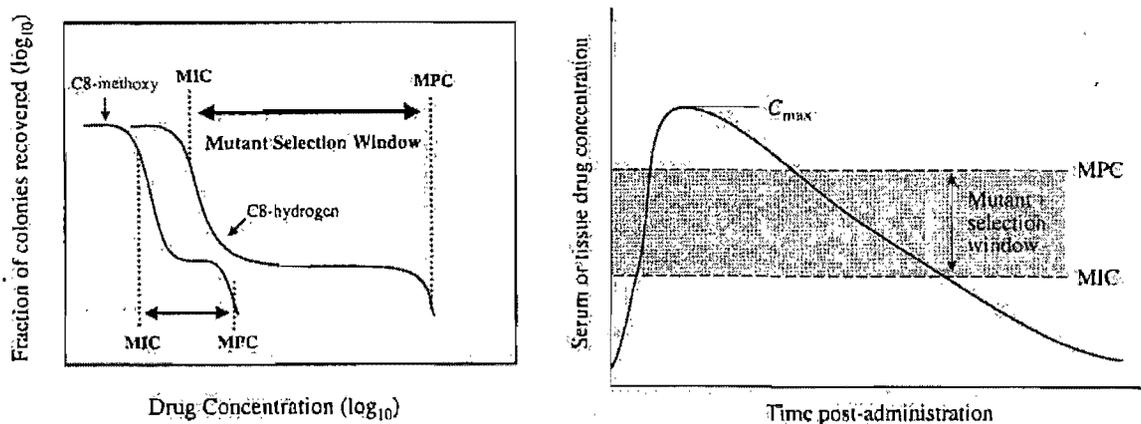
Des modèles expérimentaux sur animaux et des observations cliniques chez l'homme ont démontré que les valeurs de l'aire sous la courbe (AUC) (qui dépend de la dose, de la biodisponibilité et de la clairance) et de Cmax sont les principaux indicateurs d'efficacité. Ainsi, des études ont démontré qu'un rapport Cmax/CMI supérieur à 10-12 permettait d'accroître l'efficacité bactéricide des FQ vis-à-vis des bactéries ayant une CMI élevée et ainsi prévenir la sélection de bactéries résistantes [77, 135]. De même, un rapport AUC₂₄/CMI supérieur à 25-35 permet une éradication lors d'infection par *Streptococcus pneumoniae*, alors que ce rapport devra être supérieur à 100 pour une efficacité optimale contre les bacilles à Gram négatif, réduisant ainsi les risques d'antibiorésistance [77, 128, 135].

Une vision globale du développement de résistances aux FQ au niveau de toute la population bactérienne fait intervenir les concepts de concentration de prévention des mutants (CPM) et de fenêtre de sélection des mutants (FSM). La CPM est définie comme la plus faible concentration en antibiotique permettant de prévenir la croissance de toute colonie de bactéries résistantes à partir de 10¹⁰ CFU [34]. Durant les dernières années, elle a ainsi été déterminée expérimentalement pour plusieurs associations de bactéries et d'antibiotiques. Expérimentalement, la courbe représentant le nombre de CFU restantes en fonction de la concentration en FQ présente un profil particulier (**Figure 3**) : la première pente négative (intervenant autour de la CMI pour 99 % des cellules présentes) est attribuée à l'inhibition de croissance des bactéries de phénotype sauvage. Puis, un plateau, correspondant à la FSM, intervient au niveau duquel le nombre de CFU reste constant malgré l'augmentation des concentrations en FQ. Il est dû à la présence de mutants résistants (résistance due à une première étape de mutation ou d'acquisition de gènes exogènes de résistance). La fourchette de concentration en FQ et la quantité correspondante de CFU présentes dépendent de la nature de l'antibiotique, du type de bactérie, du nombre d'enzymes cibles et de leur sensibilité vis-à-vis de l'antibiotique [34, 148, 149]. La seconde pente intervient lorsque la concentration en FQ est

suffisante pour bloquer la croissance de ces mutants, déterminant ainsi la valeur de la CPM. Au-delà de cette concentration, deux mutations (ou acquisition de gènes exogènes de résistance) transférant à la bactérie un degré de résistance très élevé sont nécessaires à la survie de la souche bactérienne, événement dont la fréquence est négligeable [34, 148, 149].

En rapportant ces données sur la courbe pharmacocinétique des FQ, la concentration de celles-ci se retrouve la majorité du temps dans la fenêtre de sélection et enrichie donc le milieu en souches résistantes (**Figure 3**). Au niveau d'un hôte immunocompétent, les défenses immunitaires éliminent en général ces mutants, notamment lorsque les bactéries sensibles sont bloquées par l'antibiotique. Toutefois, à l'échelle d'une population, ce phénomène présente de nombreuses conséquences cliniques, comme le développement d'infections chez des sujets immunodéprimés et l'enrichissement des « réservoirs » [148].

Figure 3 : Effet des concentrations en fluoroquinolone sur la sélection de souches résistantes de *Mycobacterium bovis* BCG et schématisation pharmacocinétique de la fenêtre de sélection des mutants.



(D'après [34, 148])

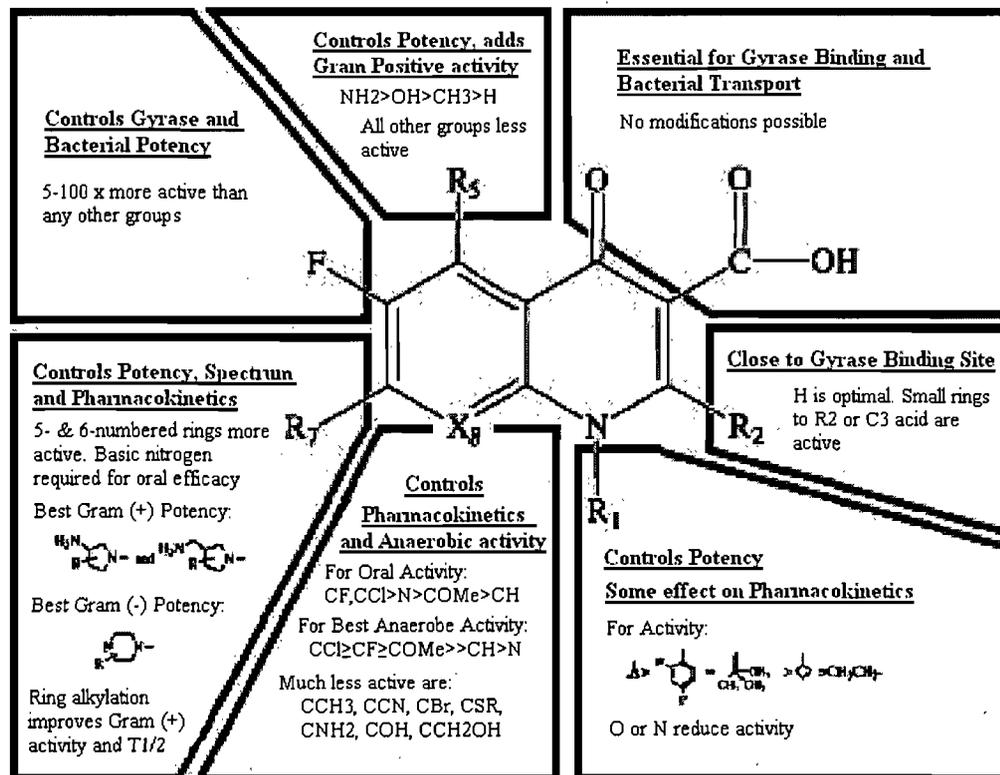
Trois approches sont ainsi possibles pour contrer le développement de souches résistantes. Tout d'abord, une indication clinique serait logiquement que les concentrations sériques ou tissulaires de l'antibiotique administré au niveau du site d'infection soient situées dans la fenêtre de sélection le moins de temps possible. Il serait donc intéressant d'avoir des composés qui atteignent rapidement, en début de traitement, des concentrations supérieures à la CPM, s'y maintiennent durant toute la durée de traitement et chute rapidement sous la CMI en

fin de traitement. Cette situation est malheureusement rarement rencontrée, notamment à cause du fait que les posologies sont établies afin de dépasser la CMI et non la CPM [148]. Une autre approche est de favoriser l'utilisation et le développement de molécules présentant une fenêtre de sélection de mutants (soit un index de sélection CPM / CMI) la plus étroite. Cet index est néanmoins très spécifique et doit être établi pour chaque combinaison antibiotique - bactérie. Enfin, pour les molécules dont la CPM est trop élevée, il est possible de recourir à une polythérapie en associant deux antibiotiques ou plus de manière à avoir une concentration de chacun au-delà de sa CMI et ainsi se retrouver plus facilement hors de la FSM « jumelée » [148].

2.1.4. Mode d'action et spectre d'activité

Les FQ ont une action bactéricide qui dépend essentiellement de l'agencement carbonyle-carboxylique, du fluor sur C6 et des substitutions sur C7 (Figure 4).

Figure 4 : Activité antibactérienne des fluoroquinolones en relation avec leur structure moléculaire.



(D'après [33])

Les FQ agissent au niveau de deux enzymes bactériennes, l'ADN-gyrase et la topoisomérase IV. Ce sont des enzymes tétramériques, composées de deux fois deux sous unités, respectivement GyrA/GyrB et ParC/ParE, codées par les gènes *gyrA/gyrB* et *parC/parE*. Elles font partie des topoisomérases de type 2 qui interviennent dans la réplication de l'ADN : l'ADN-gyrase catalyse les modifications dans le degré de superenroulement de l'ADN double-brin et la topoisomérase IV a un rôle dans la relaxation de l'ADN duplex et la séparation des chromosomes fils après la réplication [77]. Les FQ agissent en stabilisant de manière irréversible le complexe enzyme-ADN. Ceci empêche la progression des complexes de réplication et de transcription entraînant alors la fragmentation du chromosome et la mort de la bactérie [3, 55, 77, 135]. La cible principale semble être l'ADN-gyrase pour les bactéries à Gram négatif et la topoisomérase IV pour les bactéries à Gram positif [55].

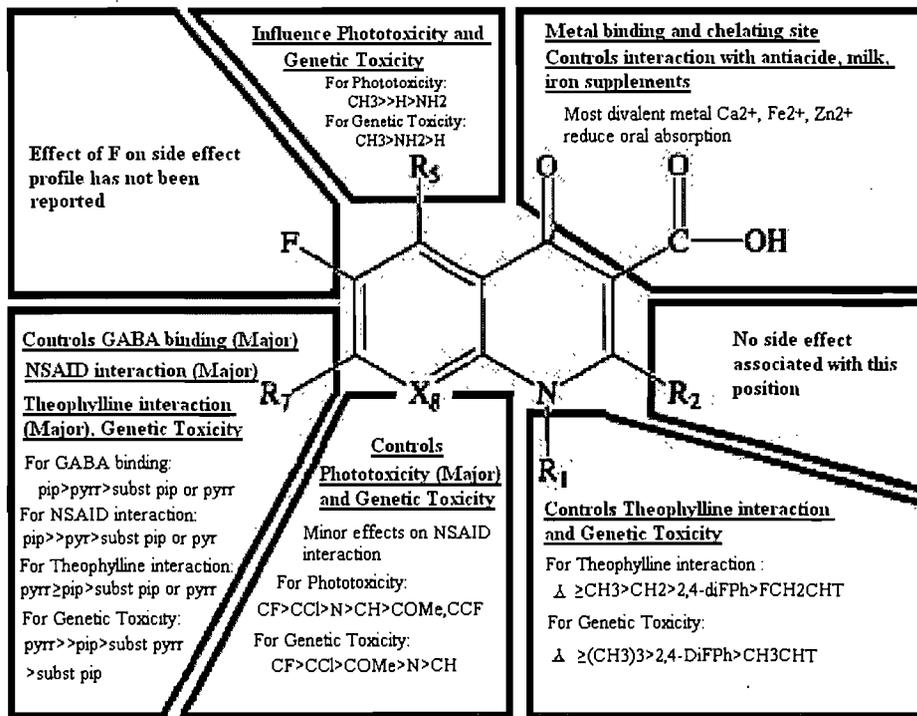
Les FQ ont un large spectre d'action : elles sont très efficaces contre les bactéries à Gram négatif, notamment les Entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Shigella* spp., etc.) et les agents intracellulaires (*Brucella* spp., *Chlamydia* spp.). Elles présentent également une bonne activité contre les staphylocoques, dont ceux résistants à la méthicilline, mais ont une activité variable à faible contre les streptocoques. Leur efficacité est nulle contre les bactéries anaérobies sauf pour la dernière génération de FQ comme la trovafloxacin, la gatifloxacin, la moxifloxacin, la gemifloxacin et la sitafloxacin [3, 35, 77, 135].

2.1.5. Indications cliniques chez les animaux de compagnie et effets indésirables

Les FQ sont indiquées pour le traitement des infections de l'appareil uro-génital et respiratoire, les infections cutanées et osseuses et les gastroentérites bactériennes sévères [3, 35]. Elles se sont également révélées très efficaces dans le traitement d'infections sévères chroniques dues à des bactéries à Gram négatif multi-résistantes. De par leurs qualités pharmacologiques (possibilité de traitement entérale efficace, spectre d'action large, très bonne diffusion tissulaire, peu d'effet secondaires), les FQ se sont avérées très intéressantes dans le traitement des infections osseuses, devenant même, seules ou en association, le traitement de choix des OMPT [66, 105]. Malheureusement, leur utilisation croissante a entraîné une augmentation du nombre de souches bactériennes résistantes [9, 36]. Ces observations ont été faites aussi bien en médecine vétérinaire (animaux de compagnie et de rente) qu'en médecine humaine.

Les FQ sont caractérisées par une très bonne marge de sécurité et une faible toxicité [135]. Les principaux effets secondaires rapportés chez l'homme et les animaux concernent l'appareil digestif (nausée, vomissement, douleur abdominale et diarrhée), le système nerveux central (convulsions, maux de tête, vertige, fatigue, baisse de vigilance, etc.) et le cartilage des jeunes patients (érosions irréversibles des cartilages articulaires et de croissance) [3, 33, 35, 135]. Des effets secondaires sur la peau (photosensibilisation), l'activité cardiaque (hypotension et bradycardie suite à une injection IV, augmentation de l'intervalle QT) et les tendons (tendinite, rupture) sont également rapportés ou observés expérimentalement [33, 135] (**Figure 5**). La possibilité de traitement entérale et la présence d'une élimination intestinale des FQ par les glycoprotéines P entraînent également des effets sur la flore intestinale du patient. Ces effets sont doubles : une éradication réversible des souches sensibles (entérobactéries) diminuant ainsi leur effet de barrière à l'encontre de nouveaux pathogènes et une sélection associée à une prolifération des souches résistantes [125, 138]. Enfin, étant donné un effet synergique potentiel sur la repolarisation cardiaque, les FQ ne devraient pas être administrées avec des médicaments prolongeant l'intervalle Q-T comme l'érythromycine, le disopyramide et les anti-dépresseurs (amitriptyline) [77].

Figure 5 : Effets secondaires des fluoroquinolones en relation avec leur structure moléculaire.



(D'après [33])

2.2. Mécanismes d'antibiorésistance

2.2.1. Mutations

L'émergence d'une résistance à un antibiotique peut découler de mutations au niveau de certains gènes. Une mutation est un processus normal qui se produit sporadiquement lors de la réplication bactérienne. Ces mutations peuvent induire une résistance par deux catégories de mécanismes :

- des mécanismes pharmacocinétiques, en diminuant le niveau d'exposition de la cible à l'antibiotique : cette catégorie comprend l'imperméabilité, l'efflux et la biotransformation (par exemple, la production d'enzymes inactivant ou modifiant l'antibiotique (ex : β -lactamases)) ;
- des mécanismes pharmacodynamiques, en diminuant l'intensité de l'effet de l'antibiotique sur sa cible : cette catégorie comprend l'altération des cibles et les voies métaboliques de remplacement [29].

Dans le cas des FQ, les mécanismes de modification des cibles, d'imperméabilité et d'efflux ont été mis en évidence.

Les principales mutations interviennent au niveau de *gyrA* ou *parC* dans une zone appelée région déterminant la résistance aux quinolones (QRDR) [54, 98]. La résistance induite par les mutations serait due à la modification de conformation de GyrA ou ParC et donc du complexe enzyme-ADN, au niveau duquel les FQ ne pourraient alors plus interagir (**Figure 4**). Les principales mutations de *gyrA* interviennent au niveau de Ser83 et de Asp87, même si d'autres sites ont également été décrits (**Annexe 1**) [54,98,118]. Les mutations de *parC* les plus fréquentes sont au niveau de Ser80 et Glu84 (**Annexe 1**) [54]. Les nombreuses mutations possibles de *gyrA* et *parC* sont ainsi à l'origine de nombreux phénotypes, dont la résistance aux FQ est variable : par exemple, pour la ciprofloxacine, la CMI des souches mutantes peut varier entre 0.05 et 64 $\mu\text{g/mL}$ [2]. Des mutations au niveau de *gyrB/parE* ont également été décrites mais sont de moindre fréquence et importance (**Annexe 1**) [118]. Récemment, un autre mécanisme de résistance a été décrit chez les entérobactéries par l'acquisition du gène *qnr* plasmidique codant pour une protéine protégeant l'ADN-gyrase de l'action des FQ [19, 77, 145].

L'établissement d'une résistance aux FQ se fait normalement par étapes, suite à une série de mutations. Chaque étape diminue la sensibilité de la bactérie pour aboutir, après un nombre variable d'étapes, à une résistance complète. Ces mutations interviennent d'abord au niveau du site codant pour l'enzyme cible primaire, puis au niveau du site codant pour l'enzyme cible secondaire et ainsi de suite. L'ADN-gyrase a été déterminée comme cible primaire chez *E. coli* et toutes les bactéries à Gram négatif alors que c'est la topoisomérase IV pour *S. aureus* et les bactéries à Gram positif [54].

Afin d'atteindre les enzymes cibles présentes dans le cytoplasme, les FQ doivent traverser la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif, plus la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Les bactéries résistantes parviennent à réduire la quantité d'antibiotique intracellulaire en limitant son entrée par les porines (bactéries à Gram négatif) ou en augmentant son élimination par les pompes à efflux (bactéries à Gram négatif et à Gram positif).

Concernant les porines des bactéries à Gram négatif, des mutations du régulon *marRAB* ont été observées chez des souches d'*Escherichia coli* résistantes à de nombreux antibiotiques. Ces mutations seraient à l'origine d'un nombre moindre de porines et donc une diminution de l'entrée des FQ dans la bactérie [54, 118]. Les systèmes de pompes les plus étudiés ont été NorA de *S. Aureus* et Bmr et Blt de *Bacillus subtilis* chez les bactéries à Gram positif et les pompes à efflux AcrAB-TolC d'*E. coli* et *mexAB-oprM*, *mexCD-oprJ* et *mexEF-oprN* de *Pseudomonas aeruginosa* chez les bactéries à Gram négatif (**Annexe 2**) [54, 98]. Les FQ apparaissent comme des substrats « accidentels » de ces pompes. Des mutations spécifiques au niveau des gènes régulant leur expression ou codant pour leur synthèse augmenteraient donc la quantité de pompes au niveau de la membrane cytoplasmique et permettrait de réduire la quantité de FQ présente dans la cellule. Ceci contribuerait ainsi à l'apparition de résistances de faible niveau.

Il a été démontré que pour arriver à une souche bactérienne hautement résistante, de multiples mutations sur plusieurs gènes, notamment *gyrA*, *parC* et ceux intervenant dans les systèmes d'efflux et les porines, étaient nécessaires [98]. Il a été démontré que les mutations augmentant l'activité d'efflux intervenaient dans la première étape, permettant aux bactéries de survivre et de présenter des mutations au niveau des gènes codant pour les enzymes cibles [97].

2.2.2. Sélection d'un gène de résistance bactérienne

L'exposition ultérieure de cette souche résistante à une FQ va alors avoir un effet de sélection, dépendant du niveau d'exposition atteint, et accroître considérablement la proportion de souches résistantes et donc le nombre de copies du gène de résistance au sein d'un écosystème. L'intensité de cette sélection dépend de deux facteurs principaux :

- les caractéristiques de l'espèce bactérienne : plus la taille de la population bactérienne sera importante et sa croissance rapide, plus la pression de sélection aura d'effet [142].
- les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de l'antibiotique [2, 123]. Des résistances apparaîtront plus facilement avec des antibiotiques moins actifs et chez des souches ayant une sensibilité intrinsèque faible, telles que les FQ chez *P. aeruginosa* et *S. aureus*, étant donné qu'un plus petit nombre de mutations sera nécessaire [9, 123]. De même, des concentrations d'antibiotique se situant dans la FSM seront à l'origine d'une pression de sélection accrue [34, 148, 149].

Étonnamment très peu de données sont disponibles actuellement concernant le potentiel de sélection de bactéries antibiorésistantes par différents schémas thérapeutiques (voies d'administration). À notre connaissance, une seule étude réalisée sur des porcs a rapportée la sélection de résistances chez des souches de *Salmonella Typhimurium* « inoculées » et chez *E. coli* lors d'administration d'enrofloxacin (EFX) pendant trois jours consécutifs par voie orale ou IM. Après un jour de traitement, les comptes bactériens avaient chuté de 10^6 - 10^7 à 10^3 - 10^5 CFU/g. La population initiale de coliformes était alors totalement remplacée par une population résistante à l'EFX en quantité équivalente aux comptes initiaux en un jour supplémentaire lors d'administration IM et en deux jours lors d'administration orale. La prédominance d'une population de coliformes résistants avait persisté pendant 10 jours puis avait décliné progressivement. La sélection de résistance parmi *Salmonella* était quant à elle réduite lors d'administration par voie IM comparativement à la voie orale et lorsque la dose administrée augmentait (de 2,5 à 7,5 ou 15 mg/kg) [139].

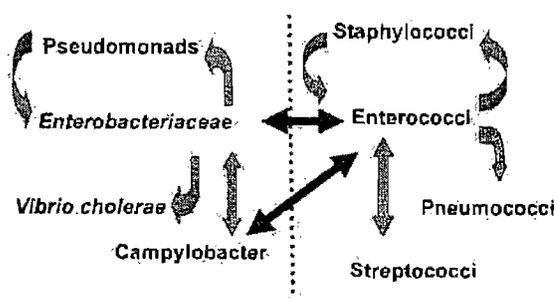
2.2.3. Dissémination du gène de résistance

La transmission de ce caractère de résistance peut se faire, au niveau cellulaire, selon deux modalités : « verticalement » aux cellules filles issues de la répllication bactérienne ou

« horizontalement » à d'autres bactéries par le transfert de plasmides, récemment mis en évidence [19, 145], ou d'autres déterminants génétiques (transposons, intégrons). La transmission de l'ADN chromosomal va permettre une dissémination du gène de résistance aux autres bactéries de la même espèce, présentes au niveau de la même niche écologique. Par contre, l'ADN plasmidique peut être transmis à d'autres espèces bactériennes et ainsi permettre l'émergence du gène de résistance dans de nouvelles niches (**Figure 6**) [91].

Grâce à cette capacité des bactéries de transférer aisément leur matériel génétique, il est possible que des antibiorésistances émergent chez des populations n'ayant jamais été exposées à un antibiotique [82]. Une contamination par des bactéries résistantes peut ainsi se faire par ingestion d'aliments et d'eau contaminés, par contact entre personnes ou par contact entre une personne et un animal [111]. La présence du gène de résistance chez de nombreuses espèces bactériennes et au niveau de nombreuses niches écologiques permettrait sa persistance dans l'environnement, même si ce gène est rare et n'est pas sélectionné. La sélection de souches ayant acquis leur résistance par plasmide est également un facteur de persistance. En effet, ces plasmides peuvent comporter des gènes codant pour une résistance à plusieurs antibiotiques ou autres substances (mercure et autres métaux lourds, rayons UV, etc.) et l'exposition à un seul de ces agents permet de perpétuer la sélection et la prolifération du gène de résistance correspondant, et avec lui, des autres gènes de résistance [64, 65].

Figure 6 : Diagramme exposant les échanges connus de gène de résistance aux antibiotiques entre bactéries dans la nature.



Les bactéries du côté gauche sont à Gram négatif et celles du côté droit, à Gram positif. Les flèches noires indiquent les échanges génétiques entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif. (D'après [119]).

Une des questions principales est de savoir si une réversion, complète ou partielle, de l'antibiorésistance est possible, et combien de temps elle nécessiterait. En théorie, l'arrêt de l'exposition des souches résistantes à un antibiotique devrait supprimer l'avantage sélectif de cette population. La prévalence de ces résistances devrait alors se stabiliser, voire diminuer,

étant donné que d'autres mutations « dilueraient » ce caractère devenu inutile [82]. Cependant, malgré la restriction voire un arrêt hypothétique d'utilisation des antibiotiques, les modèles mathématiques développés concluent que les taux de résistance ne diminueraient que très lentement, sans atteindre le niveau originel, notamment à cause du transfert plasmidique et l'existence de « réservoirs » [64, 65].

2.2.4. Notion de « réservoir »

Un « réservoir » correspond à une population bactérienne située dans une niche écologique propice à la persistance du gène de résistance, voire à l'émergence de nouvelles mutations. En effet, bien qu'un traitement antibiotique soit généralement dirigé contre une bactérie pathogène spécifique, les bactéries commensales (du tube digestif, du nasopharynx et de la peau, etc.) sont également exposées à une administration systémique ou locale [58, 113]. Une attention accrue a été portée à la flore fécale des individus sains comme réservoir et source de gène de résistance, notamment dans les pays en voie de développement [123]. Toutes les études réalisées sur *E. coli*, constituant un universel de la flore fécale, ont démontré que le traitement antibiotique était associé à une augmentation de la prévalence de souches résistantes à l'antibiotique reçu [114, 139]. Ces études mettent en évidence le fait que la flore bactérienne fécale constitue un réservoir majeur intervenant dans les échanges de souches résistantes. Malgré un nombre bien moindre d'études concernant les autres flores commensales (nasopharynx, peau, etc.), il semble évident que celles-ci puissent jouer le même rôle.

2.3. Observations cliniques

2.3.1. Chez les humains

La plupart des cas de résistance aux FQ concernent *Staphylococcus* (notamment *S. aureus*, résistant à la méthicilline ou non), *Streptococcus* (notamment *S. pneumoniae*), *Enterococcus* (notamment *E. faecalis*), *Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni* et d'autres entéropathogènes et *Pseudomonas aeruginosa* [9, 36]. Aux Etats-Unis, le nombre de bactéries à Gram négatif résistantes à la CFX isolées chez des patients en soins intensifs a

augmenté de 10 % de 1990-1993 à 1994-2000. Les principales bactéries incriminées étaient *Pseudomonas aeruginosa* (13 %), *Enterobacter* spp. (6 %) et *Klebsiella* spp. (7 %) [56]. Une étude réalisée dans un centre hospitalier espagnol a également mis en évidence une augmentation du taux de résistance à la ciprofloxacine chez *E. coli* provenant de prélèvements urinaires de 3 à 20 % entre 1990 et 1996, parallèlement à une nette augmentation de l'utilisation de cet antibiotique [36]. Le même type d'observations a également été décrit aux Pays-Bas et à Shanghai pour *E. coli*, au Danemark pour *Salmonella enteritica* Enteritidis, en Australie pour *S. pneumoniae*, en Angleterre et au Canada pour *P. aeruginosa* pour n'en citer que quelques unes [2, 9, 45, 123].

Plus préoccupant encore est le rôle potentiel de la résistance aux FQ dans les résistances simultanées à plusieurs antibiotiques. Ainsi, de nombreuses résistances vis-à-vis d'autres antibiotiques (gentamicine, ceftazidime, imipenem, etc.) apparaissent surreprésentées chez les souches résistantes aux FQ [42, 56]. Ces observations pourraient résulter de la dissémination des résistances par des plasmides associant plusieurs gènes de résistances ou par des mécanismes de résistance non spécifique (pompes à efflux). Cette « multi-résistance » est d'ailleurs de plus en plus rapportée chez les *S. aureus* résistants à la méthicilline, une des bactéries à l'origine des infections nosocomiales les plus problématiques [2, 123].

2.3.2. Chez les animaux de rente

De plus en plus de rapports s'intéressent à l'émergence d'antibiorésistance chez les animaux. Les raisons de ce récent intérêt sont doubles car l'émergence d'antibiorésistances chez les animaux créé un problème de santé animale, limitant l'arsenal thérapeutique vétérinaire, mais également un problème de santé publique étant donné le risque potentiel de transmission à la population humaine.

À ce titre, les animaux de rente, notamment les porcs et les volailles, sont plus particulièrement pointés du doigt [37, 129, 140, 141, 143]. Ceci est relié au fait que ces animaux, outre une exposition « classique » aux antibiotiques « thérapeutiques », sont soumis à une exposition beaucoup plus importante aux antibiotiques utilisés en prophylaxie et/ou comme promoteurs de croissance [23, 27]. De nombreuses molécules sont ainsi largement voire systématiquement utilisées, à des doses sub-thérapeutiques, comme compléments alimentaires [23, 140-143]. Le risque de sélection de souches bactériennes résistantes, notamment au niveau

de la flore intestinale, est donc très important. Les premiers rapports de résistance aux FQ ont décrit ce phénomène chez les bovins, coïncidant avec l'homologation de l'EFX chez cette espèce [75]. Néanmoins, les nombreuses études réalisées depuis sont contradictoires et mentionnent des taux de résistance très variables: 2.6 et 12 % des souches de *Campylobacter jejuni* de poules pondeuses et de poulet de chair au Japon, 4.9 et 0 % des souches d'*Escherichia coli* de bovins et de moutons/chèvres respectivement en Espagne [12, 30, 32, 78, 101, 143, 147].

Les études actuelles tentent de mettre en évidence une transmission animal - homme. Malgré un nombre croissant d'observations tendant à confirmer l'hypothèse d'une transmission de l'animal à l'homme via l'alimentation (viande contaminée) ou un contact direct, ce thème reste un sujet de débat entre ceux qui remettent en question les récentes interdictions d'utilisation de certains antibiotiques chez les animaux de rente et les partisans de l'application de telles mesures restrictives [57, 113, 129, 132, 140, 141, 143].

2.3.3. Chez les animaux de compagnie

La médecine des animaux de compagnie est sûrement le domaine où le problème de l'émergence d'antibiorésistance est le moins documenté. Plusieurs rapports semblent démontrer que, depuis leur mise sur le marché dans les années 1990, aucune augmentation notable du taux de résistance aux FQ n'a été observée [41, 80]. Cependant, d'autres études réalisées récemment réfutent ces conclusions. Une étude réalisée en 2003 à l'Université du Missouri démontrait une augmentation significative de 20 % du nombre de souches d'*E. coli* et de *Streptococcus spp.* résistantes aux FQ entre 1992 et 2001 sur des prélèvements urinaires de chiens [22]. Une autre étude réalisée à l'Université de Californie corrobore cette conclusion en constatant une augmentation, sur 4 ans seulement (1994 à 1998), des souches d'*E. coli* résistantes aux FQ à partir de prélèvements urinaires de chiens présentant une infection urinaire [24]. Une autre étude encore, réalisée entre 1984 et 1998 à l'Université d'Ontario, démontre une augmentation linéaire du taux de résistance aux FQ au fil des années, en corrélation directe avec la quantité de FQ utilisée [100].

Devant l'émergence inquiétante des antibiorésistances, de nombreuses institutions ont développé des programmes spécifiques pour enrayer cette crise d'aspect « épidémique », comme la « Global Strategy for the Containment of Antimicrobial Resistance » de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Deux objectifs principaux ont été définis : rendre raisonné l'usage des antibiotiques et prévenir la dissémination des souches bactériennes résistantes (**Annexe 3**). Un des objectifs principaux de ces mesures est de réduire la consommation globale d'antibiotiques afin de limiter la pression de sélection qu'ils exercent au niveau de l'écosystème bactérien. Cela a ainsi encouragé le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Parmi celles-ci, les systèmes à libération locale maîtrisée (SLLM) sont en plein essor et démontrent une efficacité tout à fait intéressante dans la gestion et la prévention de l'OMPT.

3. Les Systèmes à Libération Locale Maîtrisée

Le concept de libération locale par élution d'antibiotiques incorporés dans un implant-matrice a été introduit en 1970 par Buchholz et Englebrecht. Bien que cette technique ait été initialement utilisée dans un but prophylactique, des applications thérapeutiques ont rapidement été développées en médecine humaine et vétérinaire, notamment dans le traitement d'infections de prothèses articulaires et d'ostéomyélites post-traumatiques.

Les systèmes à libération locale maîtrisée (SLLM) peuvent être divisés en trois classes : les implants matriciels résorbables et non-résorbables, les pompes implantables et la classe des SLLM atypiques. Les implants matriciels, qui sont les plus fréquemment utilisés en orthopédie, sont chargés en antibiotique et sont placés directement au site infecté.

3.1. Avantages

Le principal avantage des SLLM réside dans leur capacité à délivrer de manière soutenue des concentrations locales d'antibiotiques très importantes, 5 à 10 fois supérieure à celles obtenues lors d'antibiothérapie systémique [51]. Dans le cadre du traitement des ostéomyélites, ceci améliore fortement la pénétration de l'antibiotique au niveau des zones dévascularisées et du biofilm recouvrant un implant chirurgical. Des bactéries réfractaires à un traitement suite à des concentrations antibiotiques locales trop faibles lors d'administration systémique sont plus sensibles aux concentrations élevées conséquentes à la mise en place d'un SLLM [49, 51, 86]. Par exemple, de nouveaux SLLM à base de poly(acide lactique) (PLA) et de FQ ont permis d'atteindre de manière prolongée des concentrations locales 100 à 1 000 fois supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) de nombreuses bactéries, notamment des *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline [60]. En outre, les très faibles, voire indétectables, concentrations sériques mesurées réduisent de manière importante les risques d'effets secondaires fréquemment rencontrés lors d'antibiothérapie systémique avec des agents ayant un index thérapeutique étroit [13, 134].

On attribue également aux SLLM les avantages d'une bonne oblitération des espaces morts conséquemment au débridement chirurgical, la possibilité d'ostéoconduction et de support mécanique, une diminution de la quantité totale d'antibiotique nécessaire lors d'un

traitement, une efficacité accrue du traitement et la persistance au site d'infection de molécules rapidement éliminées par une autre voie d'administration [13, 28]. De plus, une observance thérapeutique adéquate de la part du patient et du propriétaire n'est plus requise pour favoriser la guérison.

3.2. Caractéristiques

Un implant servant de SLLM est composé d'une matrice uniforme dans laquelle est incorporé un antibiotique. De nombreuses associations entre divers antibiotiques et matrices ont ainsi été et sont encore développées.

3.2.1. Implants – matrices

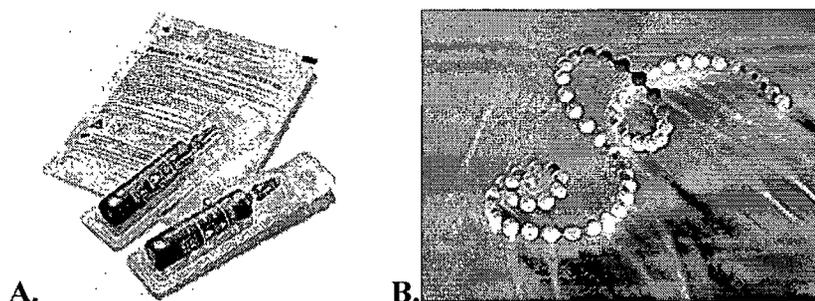
Le matériau utilisé doit présenter une bonne biocompatibilité. Il doit être inerte, non carcinogénique, hypoallergénique et mécaniquement stable aussi longtemps que doit durer l'élution de l'antibiotique [28]. Deux sortes de matrice existent : les non-résorbables, qui ont été les premières utilisées, et les résorbables, qui font l'objet de vastes recherches actuellement.

Parmi les matrices non résorbables, le matériau le plus utilisé encore aujourd'hui est le poly méthacrylate de méthyle (PMMA). C'est un ciment osseux obtenu par polymérisation exothermique d'une poudre polymère au contact d'un liquide monomère. Le composé durcit en 10 à 14 minutes pour former un matériau cohésif et poreux [116]. L'antibiotique sous forme de poudre ou de liquide peut être mélangé au polymère avant la polymérisation. Ces SLLM peuvent être fabriqués manuellement extemporanément en utilisant un antibiotique et du PMMA vendu commercialement (SimplexP®, Palacos®G, Prostalac®) ou être achetés déjà prêts l'emploi (Septopal®) (**Figure 7**) [51, 86, 137]. Les SLLM préparés à la main semblent cependant présenter de moins bonnes caractéristiques d'élution *in vitro* (quantité totale d'antibiotique libéré et concentration en antibiotique moindres) que ceux commercialisés [87].

Différentes vitesses de libération sont rapportées selon l'antibiotique et le type de PMMA employé (différant par la porosité, la perméabilité, etc.) [134]. On observe généralement une libération rapide durant les 24 premières heures après implantation (5 % de la quantité totale d'antibiotique) suivie d'une libération dégressive pouvant durer de plusieurs

semaines à plusieurs années [4, 51, 124, 134, 137]. Des études ont démontré que des concentrations antibiotiques bactéricides étaient maintenues dans les tissus et fluides en périphérie des implants pour des périodes allant jusqu'à 80 jours [137].

Figure 7 : Présentations commerciales du poly méthacrylate de méthyle.



(A) Palacos® et (B) Septopal®.

Le PMMA présente deux inconvénients majeurs en tant que matrice. Tout d'abord, une seconde chirurgie est nécessaire pour le retrait de l'implant qui peut jouer le rôle de corps étranger et favoriser la formation d'un biofilm et l'adhérence de bactéries à sa surface [60, 61, 116]. D'autre part, l'éluion de l'antibiotique depuis la matrice n'est jamais complète : seulement 5 à 25 % de la quantité initiale d'antibiotique est libérée à partir de billes de PMMA [40, 60, 131]. Ses autres inconvénients sont l'importante chaleur générée lors de la polymérisation et la toxicité systémique potentielle du monomère absorbé [79].

Le principal avantage des matrices résorbables est justement d'éliminer la nécessité d'une deuxième intervention chirurgicale, évitant ainsi des lésions supplémentaires à la vascularisation locale, et de permettre la libération complète de l'antibiotique incorporé. Les implants ne doivent toutefois pas être dégradés trop vite, ce qui nuirait à la persistance de l'antibiotique au site d'OMPT. Ces implants sont disponibles sous de nombreuses formes : microparticules, disques, billes en chapelet.

Les greffes osseuses, autogénique ou allogénique, ont l'avantage de se revasculariser et d'intervenir dans les défenses immunitaires locales et la réparation osseuse [79]. L'incorporation de l'antibiotique se fait directement par ajout à la greffe [79]. Une étude rapporte l'absence d'effet néfaste des fortes concentrations en antibiotique sur le potentiel

d'incorporation de la greffe dans le processus de guérison osseuse [81]. Une étude *in vitro* rapporte la libération de 70 % de la charge totale en tobramycine dans les 24 heures suivant l'implantation, une quantité négligeable d'antibiotique étant détectée au bout d'une semaine [81]. Une autre étude réalisée *in vivo* chez des lapins mentionne toutefois la libération de tobramycine durant une période de plus de 3 semaines [79]. Ces implants d'os spongieux semblent donc plus intéressants en mode prophylactique qu'en mode thérapeutique d'une infection osseuse étant donné leur court temps d'éluion.

Les substituts ou extenseurs de greffe osseuse sont nombreux : sulfate et phosphate de calcium, os déminéralisé, cristal bioactif, etc. Ils permettent l'ostéoconduction, n'inhibent pas le remodelage osseux lors du processus de guérison et certains peuvent être moulés pour participer au support mécanique de l'os [79, 109, 112]. Le composé le plus étudié a été le plâtre de Paris (ou gypse), un sulfate de calcium hémi-hydraté. C'est un matériau de faible coût dont la résorption est classiquement lente (quelques semaines à quelques mois) [116]. Sa formulation clinique la plus utilisée comprend 3,64 % de vancomycine et/ou 4,25 % de tobramycine [44, 79]. Les caractéristiques d'éluion dépendent de l'antibiotique incorporé mais les temps de libération sont généralement courts : une étude *in vitro* a démontré que 80 % de la gentamicine placée dans l'implant était libéré dans les premières 48 heures, des concentrations bactéricides étant maintenues durant 14 jours [116]. Une autre étude *in vitro* mentionne la libération de 17 % de la charge totale en tobramycine en 24 heures, des traces de l'antibiotique étant retrouvées 3 semaines après implantation [81]. Les études cliniques d'efficacité apparaissent concluantes, notamment en prophylaxie [44, 88]. L'hydroxyapatite (céramique de phosphate de calcium), composant minéral de l'os, est un composé très prometteur. La plupart des études réalisées rapportent des durées d'éluion assez grandes, de 14 à 90 jours, et une résorption de l'implant après 10 semaines [40, 116]. Les études expérimentales démontrent une efficacité similaire au PMMA dans l'éradication d'ostéomyélites localisées chez des rats et des lapins [25, 109, 112, 116].

Les polymères naturels correspondent à des éponges de collagène, de fibrine, de thrombine ou d'autres produits issus de la coagulation sanguine, dans lesquels l'antibiotique est incorporé [49, 60, 73, 116]. Les temps d'éluion sont variables mais généralement faibles, de 3 à 4 jours [60, 73, 79, 116]. Des modifications de ces implants permettent actuellement d'allonger ces temps d'éluion [73, 116]. L'avantage des polymères naturels est qu'ils présentent une excellente biocompatibilité et permettent à la néoformation osseuse de remplacer graduellement

le matériel implanté [73]. Les études d'efficacité *in vivo* sont actuellement rares mais semblent prometteuses en prévention et en traitement [116]. Une étude récente rapporte une efficacité égale entre un scellant à base de fibrine et des implants de PMMA, tous deux chargés de tobramycine, dans le traitement d'une ostéomyélite expérimentale chez des lapins [73].

Les polymères synthétiques correspondent à la catégorie la plus prometteuse et la plus active au niveau de la recherche. Les biomatériaux sont les polyanhydrides, le PLA, le poly(acide glycolique) (PGA), le poly(acide lactique-co-glycolique) (PGLA), les polyhydroxyalcanoates, le polycaprolactone, etc. [47, 107]. Ces composés sont très biocompatibles et leur utilisation permet un contrôle précis des différents aspects de l'élution. Ainsi, des modifications du ratio PLA / PGA du PGLA, de 50 / 50 à 90 / 10, permet de prolonger les temps d'élution et de diminuer l'amplitude de la libération initiale [60, 116]. Les formulations de PLA, PGA et PGLA présentent des temps d'élution *in vitro* et *in vivo* de 30 à 72 jours avec de la vancomycine, de la tobramycine et de la clindamycine [70]. Une autre étude rapporte l'élution *in vivo* de ciprofloxacine incorporée dans une matrice de PLGA permettant d'obtenir des concentrations locales supérieures aux CMI durant 6 semaines [102]. Ces implants se sont avérés aussi voire plus efficaces qu'un traitement systémique ou par SLLM à base de PMMA dans le traitement d'ostéomyélites expérimentales [17, 60, 116]. L'amidon et le chitosan présentent également des caractéristiques intéressantes et un coût abordable [5, 58].

Des matériaux composites ont également été développés : hydroxyapatite - polycaprolactone, PMMA - collagène, phosphate de calcium - gélatine, hydroxyapatite - sulfate de calcium, collagène - PGLA, hydroxyapatite - PLA [109]. Ils permettent de cumuler les avantages de chacun des composants [49].

3.2.2. Antibiotique

Idéalement, les antibiotiques utilisés doivent être bactéricides, notamment lorsque le SLLM est à but prophylactique. Ils doivent aussi être libérés localement à des concentrations supérieures à plusieurs fois (au moins 10 fois) la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'agent pathogène impliqué. Ils doivent être solubles à la fois dans l'eau et les lipides afin de permettre leur diffusion, ne présenter aucune toxicité locale, être minimalement absorbés dans la circulation systémique, être stables à la température de polymérisation (environ 70 à 100°C) pour les matrices de poly-méthacrylate de méthyle (PMMA) et ne pas affecter les propriétés

mécaniques de l'implant [51, 60, 116, 124]. L'idéal est de choisir l'antibiotique approprié en se basant sur les résultats des cultures bactériologiques. Lorsque cela n'est pas possible ou que le SLLM a un but prophylactique, le choix se portera vers une molécule à large spectre active contre les principaux germes rencontrés lors d'OMPT. En se basant sur ces critères, les agents antibiotiques les plus utilisés ont été les aminoglycosides (notamment la gentamicine et la tobramycine), les FQ et les céphalosporines [51, 60, 131].

La cinétique de libération de l'antibiotique à partir d'une matrice dépend d'une part de la concentration, de la solubilité et du coefficient de diffusion du principe actif dans cette matrice, et d'autre part de la géométrie (rapport volume/surface), de la porosité et de la vitesse de dégradation de la matrice [40, 51, 60, 124]. Pour les produits très solubles (β -lactamines), la quantité d'antibiotique relarguée dépend beaucoup de la surface de l'implant tandis que pour les produits relativement peu solubles (comme les FQ), elle dépend surtout du degré de porosité de la matrice [60]. Le degré de fibrose (donc de la réaction face au corps étranger) encapsulant l'implant joue également un rôle important car celle-ci limite la diffusion de l'antibiotique à 2 à 3 mm autour de l'implant [124]. L'élution des antibiotiques est typiquement biphasique : une libération rapide, due à la présence d'antibiotique en surface de l'implant, survient durant les premiers jours après implantation puis elle ralentit et décroît progressivement durant une période plus ou moins longue (antibiotique dans le réseau polymère) [51, 116]. Les concentrations locales d'antibiotiques peuvent rester au dessus de la CMI d'un agent pathogène pour des périodes allant de quelques jours à quelques mois selon les matrices et les antibiotiques utilisés [4, 58, 60, 116, 124]. Dans une étude évaluant l'élution *in vitro* et *in vivo* de plusieurs antibiotiques inclus dans une matrice de PMMA, les concentrations *in vitro* en CFX, clindamycine et tobramycine restaient au dessus de la CMI de *Bacillus subtilis* après quatre semaines. Il en était de même pour les concentrations en cefazolin, CFX, clindamycine, tobramycine et vancomycine dans les tissus mous péri-implants et les concentrations en CFX, clindamycine et vancomycine dans les tissus osseux péri-implants [4]. Cependant, bien que de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* aient été réalisées afin de rapporter les temps d'élution de diverses associations de matrices et d'antibiotiques, le manque de standardisation est à l'origine de données très hétérogènes et difficilement interprétables. En outre, aucune corrélation entre les données *in vitro* et *in vivo* n'est établie, ne permettant aucune comparaison [79].

3.3. Efficacité clinique

3.3.1. Rôle prophylactique

Les deux indications principales sont la mise en place de prothèses articulaires cimentées (hanche et genou) et la prévention d'infection des fractures ouvertes [137]. Cette utilisation est basée sur les conclusions de nombreuses études expérimentales où l'efficacité de la prévention des infections par les SLLM était égale voire supérieure à celle obtenue par un traitement parentéral [58, 124, 137]. Des séries de cas cliniques ont également été rapportées en médecine humaine, avec des conclusions diverses (**Tableau II**).

Tableau II : Principales études comparant les taux d'infection lors d'administration systémique d'antibiotique ou de mise en place d'un système à libération locale maîtrisée.

Nombre de patients	Type d'étude	Indication clinique	Taux d'infection (%)		Référence	
			SLLM	Antibiotique systémique		
667	Rétrospectif	Mise en place de prothèses articulaires	0,6	4,1	Thierse, 1978	
4 825			0,9	0,8	Espehaug et coll., 1997	
800			0	0	Pfarr et Burri, 1979	
445	1,1		5,9	Wannske et Tscherne, 1979		
1 688	Prospectif		0,8	1,9	Josefsson, 1988	
401			1	1	McQueen et coll., 1990	
92 675			/	/	Malchau et coll., 1993	
340			0	3,1	Chiu et coll., 2002	
1 085	Rétrospectif		Fractures ouvertes	3,7	12	Ostermann et coll., 1995

Une étude rétrospective sur 10 905 cas de révisions de prothèses de hanches démontre un taux d'infection moindre lors d'association antibiothérapie systémique – SLLM et respectivement 4,3, 6,3 et 11,5 fois plus de chances d'infection lors d'antibiothérapie systémique seule, de SLLM seul et aucun traitement antibiotique [39]. Une autre étude sur 92675 cas conclut à l'intérêt des SLLM lors de mise en place de prothèses de hanche, en première intention et lors de révision [74].

Au vu de ces résultats, il semble raisonnable d'affirmer que la prophylaxie assurée par un SLLM est égale, et vraisemblablement supérieure, à celle obtenue par administration systémique d'antibiotiques. Une étude prospective distribuée de manière aléatoire serait nécessaire pour confirmer avec certitude la supériorité prophylactique des SLLM. Cependant, étant donné les faibles taux d'infection actuels, une telle étude nécessiterait un nombre de patients considérable pour démontrer une différence significative [137].

3.3.2. Rôle thérapeutique

Les deux indications cliniques principales sont le traitement des infections de prothèses articulaires et de l'ostéomyélite post-traumatique. En 1972, Klemm introduisit le concept de SLLM dans le traitement des ostéomyélites. Buchholz fut le premier, en 1981, à utiliser un SLLM lors de révision de prothèses de hanches avec des taux de succès très intéressants : 77 % lors de chirurgie unique et 90 % lors de révision par étapes. Leur efficacité a par la suite été clairement démontrée par de nombreuses études expérimentales puis confirmée par de nombreux rapports de cas et études prospectives et rétrospectives en médecine humaine et vétérinaire [16, 20, 58, 124, 131, 134, 137]. Mader et coll. comparent par exemple l'efficacité thérapeutique de l'administration de tobramycine par un SLLM à base de fibrine, un SLLM à base de PMMA ou injections sous-cutanées sur un modèle d'OMPT chez des lapins [73]. Les deux SLLM entraînaient une réduction significativement plus importante des comptes bactériens intramédullaires par rapport à la voie parentérale, bien qu'aucune différence significative ne fût observée en comparant les comptes bactériens au niveau osseux.

Les taux de succès classiquement rapportés lors de traitement d'ostéomyélite par SLLM sont d'environ 80 à 90 % et apparaissent similaires ou supérieurs à ceux d'une antibiothérapie systémique [13, 58, 86, 137].

3.4. Inconvénients

Les inconvénients liés à l'utilisation de SLLM sont rares. Concernant les SLLM non résorbables comme le PMMA, un inconvénient majeur est la nécessité d'une chirurgie ultérieure pour le retrait des implants. Pour les SLLM résorbables, notamment le PLGA et

l'hydroxyapatite, le principal frein à un usage courant est leur coût et leur disponibilité commerciale. Bien que la plupart d'entre eux présente une excellente biocompatibilité, certains SLLM peuvent agir comme des corps étrangers ou inhiber certaines composantes de la réponse immunitaire (protéines du complément, lymphocytes périphériques et polynucléaires). Ces effets sont cependant modérés et se manifestent plus histologiquement que cliniquement [116, 137]. Une question soulevée par l'usage de SLLM est la toxicité potentielle de fortes concentrations en antibiotique sur l'os et donc l'impact sur la guérison osseuse. De récentes études *in vitro* ont en effet démontré l'occurrence d'effets secondaires importants sur la cicatrisation osseuse de certains antibiotiques, notamment les FQ et de la rifampicine [53]. Toutefois, aucune étude *in vivo* ou observation clinique n'a été réalisée à ce jour.

L'interrogation ayant certainement le plus d'importance est le rôle potentiel des SLLM dans le développement de résistances bactériennes, évoqué par de nombreux articles [48, 58, 79, 116, 130, 131, 137]. Après une première phase de libération rapide (largement au-dessus des CMI), les SLLM entraînent effet des concentrations locales en antibiotique basses, durant une période prolongée, susceptibles d'exercer une sélection de souches résistantes parmi la flore pathogène. De plus en plus de rapports cliniques mentionnent d'ailleurs l'augmentation de résistances vis-à-vis des aminosides suite à l'usage de SLLM [108, 117, 127, 136]. Ainsi, dans une étude sur 33 cas humains d'infection articulaire de la hanche, le taux de résistance à la gentamicine parmi les bactéries isolées était de 29 % en préopératoire et de 41 % en postopératoire [136]. Cependant, la problématique est rarement exposée avec clarté, ce qui est parfois source de mauvaise interprétation. Au sens strict du terme, l'acquisition par une bactérie d'une résistance vis-à-vis d'un antibiotique est corrélée à un caractère intrinsèque, et non à des facteurs environnementaux. Or, il a été largement démontré que le biofilm produit par certaines bactéries adhérees à la surface de corps étrangers, comme les SLLM, augmentait de manière très importante la tolérance de la population bactérienne à de nombreux antibiotiques. La présence d'un biofilm va créer des conditions défavorables à l'action antibiotique, sans que la sensibilité intrinsèque des bactéries soit mise en jeu. Ceci est documenté par plusieurs études rapportant des sensibilités inférieures des bactéries liées à différents implants (PMMA seul, silicone, etc.) par rapport à des bactéries libres, après exposition à un antibiotique [8, 85]. Lors de l'utilisation de SLLM, deux composantes sont donc potentiellement à l'origine de résistances bactériennes : la présence de l'implant en lui-même, qui permet la formation d'un

biofilm, et l'exposition à des concentrations antibiotiques sub-inhibitrices, cette dernière étant le réel sujet de questionnement. Pour cette raison, l'interprétation de certaines études expérimentales porte à confusion. Ceci est notamment illustré par deux études sur des implants de PMMA, contenant ou non un antibiotique [61, 122]. Les implants étaient exposés à des inocula de *Staphylococcus* spp. durant 14 jours dans le modèle *in vivo* (chez des rats) et durant 24, 48 et 96 heures dans le modèle *in vitro*. Les analyses bactériologiques réalisées révélaient dans les deux cas la présence de bactéries adhérees vivantes et une augmentation du taux de résistance de ces bactéries à l'antibiotique incorporé. Or, dans les deux articles, il est clairement énoncé que la concentration locale en antibiotique durant toute la période d'exposition était au-delà des CMI. L'absence de bactéricidie doit donc être imputée à la présence d'un corps étranger permettant l'adhésion bactérienne, et non à la présence de concentrations antibiotiques sous-inhibitrices.

Enfin, les SLLM sont responsables de taux systémiques d'antibiotiques très bas. Ceci a l'avantage de limiter la toxicité générale du produit mais présente l'inconvénient d'exposer toute la flore commensale du patient traité à ces taux sous-inhibiteurs. La problématique du développement de résistance doit donc être également appliquée à cette population, et non être focalisée sur les bactéries pathogènes qui, si elles constituent cliniquement la population d'intérêt, jouent potentiellement un rôle de réservoir bien secondaire par rapport aux bactéries commensales. À notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à cet aspect du sujet.

Le risque de développement de résistances bactériennes liées à l'utilisation de SLLM est réel, ce qui amène plus en plus d'auteurs à se questionner sur leur usage prophylactique [48,61]. Une meilleure compréhension des conséquences de l'utilisation des SLLM sur les patrons de résistance des flores locales et commensales serait utile afin de mieux définir le ratio risque/bénéfice des SLLM dans la gestion de certaines affections orthopédiques chez l'humain et l'animal.

4. Objectifs et hypothèses de recherche

Ainsi, malgré une récente prise de conscience de l'impact des antibiotiques, et notamment des FQ, sur l'écosystème bactérien et le développement de résistances, il apparaît clairement que de nombreuses questions restent sans réponse. Parmi celles-ci, l'impact de la voie d'administration, étape-clé de l'usage des antibiotiques, sur le développement de résistances nous semble d'un intérêt majeur. Outre les voies classiques orales et injectables, l'administration locale d'antibiotique trouve de plus en plus d'indications cliniques. Malheureusement, ceci coïncide avec un nombre croissant de rapports sur leur rôle potentiel dans la sélection de souches résistantes parmi la flore pathogène [61, 108, 122, 127, 130, 131, 136].

Il semble logique que les spécificités pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des diverses modalités d'administration d'un antibiotique aient une implication dans le degré de sélection de souches bactériennes résistantes. En se basant sur le principe de la FSM, il serait intéressant de favoriser des voies d'administration permettant d'obtenir des concentrations tissulaires au dessus ou en dessous de cette fenêtre. D'après les faibles concentrations sanguines rapportées lors d'administration locale de FQ par SLLM, il est vraisemblable que les concentrations intestinales après excrétion soient inférieures à la FSM. Inversement, l'administration de FQ par voie injectable, par exemple intramusculaire (IM), pourrait entraîner des concentrations intestinales à l'intérieur de la FSM dû à l'excrétion intestinale par les glycoprotéines P. Enfin, la présence de ces glycoprotéines P limitant l'absorption intestinale des FQ administrées oralement pourrait entraîner une exposition très importante des bactéries commensales, potentiellement au dessus de la FSM.

Nos hypothèses d'étude étaient que 1) le SLLM utilisé dans ce modèle conduit à une exposition à l'EFX des bactéries commensales suffisamment basse pour limiter la sélection de bactéries résistantes chez la flore fécale étudiée, et 2) l'administration IM d'EFX est caractérisée par un taux de sélection de bactéries commensales résistantes supérieur à ceux des voies orale ou locale. Les objectifs de cette étude étaient 1) de mesurer l'exposition systémique à l'EFX et à la CFX et 2) de comparer le développement de résistances bactériennes au niveau de la flore fécale sur un modèle porcin suite à l'administration orale, intramusculaire et locale (SLLM) d'EFX.

Chapitre deuxième

MÉTHODOLOGIE

1. Animaux et conditions de logement

Vingt-et-un porcs mâles ou femelles en bonne santé, âgés de 4 à 8 semaines et pesant 14.2 ± 5.2 kg ont été utilisés. Aucun porc ne présentait une exposition antérieure à des antibiotiques. Les porcs ont été distribués de manière aléatoire parmi 3 groupes (O, M et L) avec $n=7$ par groupe. Pour des raisons pratiques, deux lots comprenant chacun trois ou quatre porcs d'un même groupe ont été étudiés simultanément : O et M, O et L puis M et L. Un nettoyage et une désinfection des locaux étaient réalisés avec un désinfectant comprenant du potassium peroxomonosulfate, de l'acide sulfamique et du dodécyl benzène sulfonate (Virkon®) à la fin de chaque groupe de traitement avant l'entrée du suivant, en respectant un vide sanitaire d'une semaine. Les porcs ont été logés de manière individuelle dans des cages séparées. Les porcs d'un même groupe étaient cependant logés dans un même cubicule avec contact direct possible. Chaque porc n'a cependant été soumis à aucun contact avec un porc d'un groupe différent, supprimant ainsi les possibilités de contamination intergroupe mentionnées dans une étude [139]. Les porcs étaient nourris deux fois par jour avec une nourriture commerciale ne contenant aucun antibiotique et avaient un accès *ad libitum* à l'eau d'aqueduc. Des mesures de désinfection classiques étaient strictement respectées par tous les manipulateurs à l'entrée et à la sortie de la zone de logement. Après l'arrivée des porcs, une période d'acclimatation de quatre jours était respectée avant l'initiation du protocole expérimental. Les porcs ont été entretenus selon les directives fournies par le Conseil Canadien de Protection des Animaux. Le protocole de recherche a été approuvé et supervisé par le Comité Institutionnel Ethique de l'Université de Montréal.

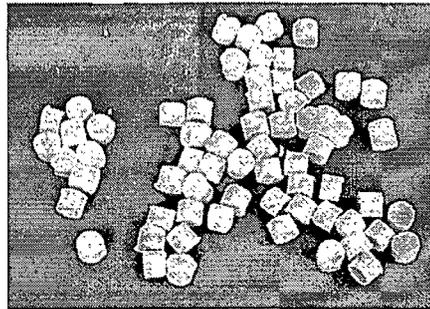
2. Produits utilisés

Une solution injectable d'EFX, Baytril® 100 mg/mL (Bayer, Toronto, Ontario) a été utilisée pour l'administration IM d'EFX. Pour l'administration orale, cette même préparation pharmaceutique a été diluée dans de l'eau MilliQ juste avant l'administration afin d'obtenir un volume final de 10 mL.

Les implants de PMMA imprégné d'EFX ont été préparés en ajoutant de manière stérile 6 grammes de poudre d'EFX (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) à 40 grammes de poudre de

polymère (Surgical Simplex® P Radiopaque Bone Cement; Howmedica Inc, Limerick, Ireland). Les deux composants étaient ensuite mélangés à la main dans un bol en plastique, le monomère liquide (20 mL) était ajouté et le mélange était versé dans des seringues de 3 mL, tel que précédemment décrit [40]. Le piston était ensuite pressé jusqu'au niveau de la marque « 0.7 mL » afin de chasser l'air et l'excès de ciment. Après durcissement du PMMA, on obtenait des implants cylindriques de 9 mm de diamètre, 7 mm de longueur, pesant environ 500 mg et contenant environ 65 mg d'EFX (**Figure 8**).

Figure 8 : Échantillon de nos implants de polyméthacrylate de méthyle contenant de l'enrofloxacin.



3. Procédures et groupes de traitement

Au jour 6 (J6) pour les groupes O et M et au jour 7 (J7) pour le groupe L, chaque porc a été prémédiqué avec une injection IM d'azapérone (2 mg/kg), de kétamine (8 mg/kg) et d'hydromorphone (0.1 mg/kg). L'anesthésie générale était ensuite induite et maintenue au masque avec un mélange d'isoflurane dans de l'oxygène à un rapport 2:98 à 3:97 vol/vol. Aucune antibioprophylaxie n'a été administrée afin de ne pas interférer avec les objectifs de l'étude. La région cervicale gauche de tous les porcs, ainsi que la face latérale de la cuisse gauche des porcs du groupe L ont été rasés et préparés de manière aseptique. Les porcs étaient placés en décubitus latéral droit. L'abord cervical a permis de mettre en place un cathéter au niveau de la veine jugulaire gauche sur tous les porcs ainsi qu'une sonde d'oesophagostomie sur les porcs du groupe O. Pour les porcs du groupe L, une incision cutanée de 10 cm était ensuite effectuée en regard de la diaphyse fémorale. Le fascia lata était incisé et les muscles biceps fémoral et vaste latéral réclinés respectivement caudalement et crânialement. Les implants préalablement préparés étaient placés directement au contact de la diaphyse fémorale en fonction

du poids de l'animal (7 implants EFX-PMMA / 10 kg de poids vif, soit 455 mg d'EFX / 10 kg de poids vif dose totale). Le fascia lata, le tissu sous-cutané et la peau étaient refermés avec un surjet simple (PDS®II 2-0 ou 3-0 et Monosof® 2-0 ou 3-0). Les porcs étaient surveillés jusqu'à leur réveil complet. L'analgésie était poursuivie par injection IM d'hydromorphone à l'extubation et du kétoprofène par voie IM (2 mg/kg par jour) en fonction du score de douleur de l'animal pendant 3 jours minimum (**Annexe 4**).

De J7 à J21, un plan de traitement a été adopté selon le groupe auquel le sujet avait été attribué (**Annexe 5**) :

- Les porcs du groupe O ont reçu de l'EFX PO à la dose de 5 mg/kg SID pendant 13 jours (soit 65 mg/kg dose totale pour les 13 jours). Le traitement a été administré via la sonde d'oesophagostomie, chaque matin à heure fixe, après avoir nourri les porcs.
- Les porcs du groupe M ont reçu de l'EFX IM à la dose de 5 mg/kg SID pendant 13 jours (soit 65 mg/kg dose totale pour les 13 jours). L'injection IM était réalisée chaque matin à heure fixe dans les lombes.
- Les porcs du groupe L ont reçu de l'EFX par la mise en place chirurgicale à J7 d'un SLLM contenant de l'EFX (soit 455 mg/10 kg dose totale) et n'ont reçu aucune autre administration d'EFX.

Etant donnée la croissance des porcs, la dose d'EFX administrée aux porcs des groupes O et M était réajustée deux fois par semaine en fonction du poids de l'animal. Au jour 21, tous les porcs étaient euthanasiés par surdosage de barbiturique administré par voie intraveineuse.

4. Méthodes d'évaluation

4.1. Suivi clinique

La prise alimentaire et l'abreuvement ainsi que le niveau d'activité de chaque porc ont été évalués quotidiennement, de même qu'un examen clinique (état général, prise de la température, du pouls, de la fréquence cardiaque et respiratoire). Outre les paramètres habituels, l'observation de signes digestifs (tel que diarrhée, etc.) et un examen rapproché des plaies chirurgicales étaient également réalisés.

4.2. Pharmacocinétique

À partir de J7, des échantillons sanguins ont été récoltés chez tous les porcs via le cathéter jugulaire pour évaluer la cinétique des concentrations d'EFX plasmatiques atteints dans tous les groupes. Les prélèvements ont été réalisés à 8 reprises durant les 32 premières heures de traitement (i.e., du jour 7 à 8) puis chaque matin du jour 9 à 21, à heure fixe, avant l'administration d'EFX chez les porcs des groupes O et M. Le cathéter était tout d'abord rincé avec 10 mL de saline héparinée, puis un prélèvement de 3 mL de sang était réalisé après avoir éliminé les premiers 5 mL. Le sang était placé dans un tube EDTA, centrifugé puis le plasma obtenu congelé à -70°C en vue d'une analyse de groupe. Les analyses ont été effectuées par chromatographie liquide et de spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) (Annexe 6).

4.3. Bactériologie fécale et cutanée

Les prélèvements fécaux ont été réalisés de J1 jusqu'à J21 sur une base quotidienne, les prélèvements entre J1 et J6 servant de période témoin pour chaque porc. Les prélèvements fécaux correspondaient à la récolte de 20 grammes de selles fraîches ou rectales. Ils étaient conservés à 4°C après prélèvement, homogénéisés et mis en culture dans les six heures suivantes. Pour chaque échantillon, 20 grammes de selles étaient homogénéisés dans un sac stérile pendant 1 minute et 5 grammes étaient dilués dans de la saline stérile (1:10) et une méthode d'ensemencement directe pour détecter les souches d'*E. coli* antibiorésistantes (limite de détection de 100 bactéries) était utilisée tel que précédemment décrit [10]. Chaque dilution (100 μL) était ensemencée sur une gélose MacConkey (Quélab, Montréal, Québec, Canada). La croissance bactérienne était examinée après incubation à 37°C pendant 16 h pour la présence de colonies fermentant le lactose et présentant une morphologie typique d'*E. coli*. Pour chaque échantillon, trois colonies étaient sélectionnées aléatoirement, purifiées sur une gélose au sang de mouton 5% (Quélab, Montréal, Québec, Canada) et confirmées sur gélose « triple sugar iron », sur gélose citratée, et par des tests d'indole et d'uréase [69]. Un isolat sur dix avec une morphologie atypique ou avec des caractéristiques biochimiques typiques d'*E. coli* était plus précisément caractérisé sur galerie API20E (Biomérieux, Hazelwood, Missouri, USA) [63]. La

sensibilité aux antibiotiques des isolats d'*E. coli* était déterminée par une technique de diffusion sur disque en gélose selon la norme M31-S1 du Clinical and Laboratory Standards Institute [84]. Les antibiotiques testés sont rapportés dans le **Tableau III**. Après une incubation à 37 °C pendant 16-18 heures, le diamètre d'inhibition était mesuré à l'aide d'une règle millimétrique.

Tableau III : Présentations des différents antibiotiques testés par antibiogramme dans notre étude.

Classe d'antibiotique	Antibiotique(s) testé(s)
	Apramycine
AMINOSIDES	Gentamicine
	Streptomycine
CÉPHALOSPORINE	Ceftiofur
FLORFÉNICOL	Florfénicol
	Acide nalidixique
FLUOROQUINOLONES	Enrofloxacin
	Ciprofloxacine
	Amoxicilline
PÉNICILLINES	Ampicilline
SULFAMIDE POTENTIALISÉ	Triméthoprime- Sulfaméthoxazole
TÉTRACYCLINE	Tétacycline

5. Analyse statistique

L'évolution des concentrations plasmatiques en EFX et CFX des porcs des groupes O, M et L a été analysée par analyse PK des moments statistiques avec WinNonlin 5.1 1 standard edition (Pharsight, Palo Alto, U.S.A.) [146]. La méthode par algorithme des trapèzes linéaires a été utilisée pour estimer l'aire sous la courbe (AUC) et l'aire sous la courbe du premier moment (AUMC) associées avec la première administration IM et orale et l'implantation des implants. Une extrapolation à l'infini de l'AUC et l'AUMC a été réalisée avec les formules standard après estimation de la pente terminale de la courbe (λ_z). Les paramètres pharmacocinétiques suivants ont été calculés : clearance systémique apparente (CL/F) et volume de distribution apparent (V/F), le temps de séjour moyen (MRT) et la demi-vie d'élimination ($t_{1/2-\lambda_z}$). En outre,

l'exposition systémique globale à l'EFX et la CFX a été estimée à l'aide de l'AUC mesurée sur toute la durée du projet.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le système SAS version 9.1 (Cary, N.C., U.S.A.) avec $p < 0.05$ considéré comme significatif. Les comptages fécaux d'*E. coli* ont été transformés en log₁₀ pour obtenir une distribution normale. Pour chaque porc, les échantillons utilisés pour tester la sensibilité bactérienne étaient choisis aléatoirement parmi les 21 jours de l'étude. Deux à trois colonies par échantillon étaient analysées. Les diamètres d'inhibition ont été transformés en log₁₀ afin d'obtenir une distribution normale permettant la réalisation de tests paramétriques. Les moyennes et erreurs-types des données transformées en log étaient soumises à la transformation inverse pour présentation dans le texte et les figures. En tenant du diamètre des disques antibiotiques, la valeur minimale pour les valeurs de diamètre d'inhibition était de 6 mm. L'évolution de la taille de la population d'*E. coli* et de la sensibilité aux différents antibiotiques des isolats a été divisée en quatre périodes, basées sur les comptages d'*E. coli* fécaux observés : (1) du jour 1 à 6, contrôle, (2) du jour 7 au moment où les comptes bactériens deviennent indétectables, phase de première exposition antibiotique, (3) durant la période où les comptes bactériens restent nuls, phase de bactéricidie et (4) du moment où les comptes bactériens redeviennent positifs jusqu'au jour 21, phase de recroissance. L'effet de la voie d'administration de l'EFX sur la durée des périodes 2 et 3 a été étudié avec une analyse de survie et un test « log-rank » afin d'évaluer plus précisément les différences tardives dans la recroissance des populations bactériennes [1]. Un modèle linéaire mixte à mesures répétées avec les périodes 1, 2 et 4 comme facteur intra-sujet, le groupe de traitement O, M et L comme facteur inter-sujet et le porc traité comme variable aléatoire a été utilisé pour évaluer les changements dans les comptes d'*E. coli* fécaux et les diamètres d'inhibition dans le temps. L'interaction traitement x temps a également été évaluée. La méthode des moindres carrés a été utilisée pour examiner les différences dans l'évolution de la taille de la population bactérienne et des diamètres d'inhibition, ainsi que les différences rapportées pour chaque groupe de traitement. Les résultats sont présentés tels que moyenne (des moindres carrés) ± erreur type, sauf si spécifié autrement. Le coefficient de corrélation de Pearson a été calculé entre chaque antibiotique testé. Un test de chi-deux exact a été réalisé pour comparer le nombre de porcs par groupe pour lesquels les comptes bactériens sont restés sous la limite inférieure de détection durant toute la période d'administration d'EFX.

Chapitre troisième

ETUDE EXPÉRIMENTALE

Publié dans

Canadian Journal of Veterinary Research

Juillet 2008

Comparison of the selection of antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* during enrofloxacin administration with a local drug delivery system or with intramuscular injections in a swine model

Romain Béraud, Louis Huneault, Dave Bernier, Francis Beaudry, Ann Letellier, Jérôme R.E. del Castillo

Abstract

This study evaluated, for the first time, the selection of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*, a potential reservoir of genes of resistance, during the prolonged exposure to fluoroquinolones after the implantation of a local drug delivery system (LDDS) in a swine model. Fourteen pigs were randomly assigned to group IM (5 mg/kg/day of intramuscular enrofloxacin — EFX) or LD (surgical implantation of EFX-polymethyl-methacrylate peri-femoral implants). Blood samples were collected daily for determination of plasma EFX and ciprofloxacin (CFX) concentrations. Fecal samples were collected daily to determine the *E. coli* counts and the susceptibility patterns of its isolates as evaluated by antibiotic disk diffusion tests. In both groups, EFX administration significantly reduced the bacterial counts after 2 days. During recolonization, the bacterial counts remained lower than baseline in group IM but not significantly, and almost reached pre-treatment levels in group LD. Susceptibility to EFX, CFX, and nalidixic acid of recolonizing *E. coli* in LD pigs slightly decreased but remained within the limit of “susceptible” isolates. In contrast, quinolone susceptibility of recolonizing *E. coli* in IM pigs dropped dramatically ($P < 0.0001$). In addition, intramuscular exposure to fluoroquinolones significantly decreased the susceptibility of *E. coli* to ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole ($P < 0.05$). In conclusion, the use of a dosing regimen that minimized the intestinal output of fluoroquinolones also minimized the selection of resistance to several classes of antibiotics. This could represent another advantage of LDDS usage compared to long-lasting systemic administration of fluoroquinolones.

Résumé

Pour la première fois une étude a évalué la sélection de résistance aux antibiotiques chez des isolats fécaux d'*Escherichia coli*, un réservoir potentiel de gènes de résistance, durant une exposition prolongée aux fluoroquinolones après l'implantation d'un système d'administration locale de médicaments (LDDS) dans un modèle porcin. Quatorze porcs ont été assignés au hasard au groupe IM (5 mg/kg/jour d'enrofloxacin [EFX] par voie intramusculaire) ou LD (mise en place chirurgicale d'un implant péri-fémoral d'EFX-polyméthyl-méthacrylate). Des échantillons sanguins ont été prélevés quotidiennement afin de déterminer les concentrations plasmatiques d'EFX et de ciprofloxacin (CFX). Des échantillons de fèces ont été collectés quotidiennement afin de dénombrer les *E. coli* et déterminer les patrons de sensibilité des isolats tels qu'évalués par la méthode de diffusion en gélose. Dans les deux groupes, l'administration d'EFX a réduit significativement les comptes bactériens après 2 jours. Au cours de la recolonisation, les comptes sont demeurés inférieurs de manière non-significative à la valeur de base dans le groupe IM, et ont presque atteint les niveaux prétraitement dans le groupe LD. Chez les porcs LD la sensibilité à l'EFX, CFX et l'acide nalidixique des *E. coli* recolonisant a diminué légèrement mais est demeurée à l'intérieur de la limite pour les isolats «sensibles». À l'opposé, chez les porcs du groupe IM la sensibilité aux quinolones des *E. coli* recolonisant a chuté dramatiquement ($P < 0.0001$). De plus, l'exposition intramusculaire aux fluoroquinolones a diminué de manière significative la sensibilité de *E. coli* à l'ampicilline et au triméthoprime-sulfaméthoxazole ($P < 0.05$). En conclusion, l'utilisation d'un régime doseur qui minimise l'excrétion intestinale de fluoroquinolones minimise également la sélection de résistance à plusieurs classes d'antibiotiques. Ceci pourrait représenter un autre avantage de l'utilisation de LDDS comparativement à l'administration systémique de fluoroquinolones à longue action.

(Traduit par Docteur Serge Messier)

Department of Clinical Sciences (Béraud), Department of Clinical Sciences, Groupe de Recherche sur les Maladies des Animaux de Compagnie (GRMAC) (Huneault), Department of Biomedicine (Bernier, Beaudry), Department of Pathology and Microbiology, Research Chair in Meat Safety, Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP) (Letellier), Department of Biomedicine, Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Groupe de Recherche en Pharmacologie Animale du Québec (GREPAQ) (del Castillo); Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal.

Address all correspondence and reprint requests to Dr. Romain Béraud; telephone: [information retirée / information withdrawn]

Dr. Béraud's current address is Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, St-Hyacinthe, Québec J2S 7C6.

Received June 19, 2007. Accepted September 21, 2007.

Introduction

Musculoskeletal infections can be difficult to treat with systemic antimicrobials because of their limited penetration into the devascularized tissues and biofilms that may be present at the infection site (1,2). The current therapeutic approach for such infections includes an aggressive surgical debridement, removal or change of fixation devices without impairing bone stability, soft tissue coverage, and long-term systemic antibiotic therapy, with a success rate varying between 80% and 90% (3,4). To improve this treatment response, local drug delivery systems (LDDS) have been developed, to allow a sustained high-level local antibiotic concentration at the infection site (1,2,5). Although elution characteristics can vary greatly among different antibiotic and LDDS combinations, the systemic absorption of the chosen antibiotic is generally poor, which leads to sustained low plasma drug concentrations and minimal risk of systemic toxicity (2,5,6). The systemically absorbed antibiotic, however, may provide concentrations within the mutant selection window (MSW) of various bacteria, a theory that has been proposed to explain how exposure to antibiotics leads to the selective enrichment of resistant cell subpopulations (7–11). In the case of veterinary fluoroquinolones, the risk of resistance selection may be significant, because P-glycoprotein has been shown *in vivo* to contribute to the intestinal excretion of this class of antibiotics (12). Hence, parenterally administered fluoroquinolones may exert a selective pressure on the intestinal microbiota, including *Escherichia coli* and other bacterial species with zoonosis potential.

While several studies have investigated the potential role of LDDS in the selection of antibiotic resistance among pathogens (13–20), none to our knowledge has evaluated the impact of the prolonged systemic antibiotic concentrations near MSW on commensal flora. Resistance selection among pathogenic bacteria is of concern as it increases the risk of infections that are refractory to classical treatments, which limits the therapeutic possibilities of practitioners. Moreover, the selection of resistance among commensal flora is equally of concern because of its insidious role as a reservoir of genes of resistance (21,22). Many reports in human and veterinary medicine have highlighted the potential for these resistant commensal bacteria to transfer resistance genes to any incoming pathogen or to themselves, leading to the possibility of infection (23–26).

The objective of this study was to investigate the selection of bacterial resistance in the fecal *E. coli* flora of a swine model during local administration of enrofloxacin (EFX) by a LDDS, and to compare the results to intramuscular (IM) EFX injections. It was hypothesized that the EFX-loaded LDDS used in this model would lead to plasma drug concentrations of EFX that would be low enough to avoid any bacterial resistance selection in the fecal flora, as opposed to that from the IM administration of EFX.

Materials and methods

Animals and housing conditions

Fourteen, 4–8-week-old healthy pigs (13.6 ± 5.9 kg) were used that were known not to have had previous exposure to antibiotics.

These pigs were randomly assigned to 2 equal groups: IM (intramuscular EFX), and LD [local delivery with EFX-loaded polymethylmethacrylate (PMMA) implants]. The pigs were housed individually in separate pens, and did not have any direct contact with pigs in the other group. The pigs were fed twice daily with an antibiotic-free commercial pig feed, and had unlimited access to water. Pigs were allowed to acclimatize for 4 d before experiment initiation on day 1. Operators always went through a rigorous disinfection procedure before entering and exiting the unit and between manipulations to avoid cross-contamination. The protocol was in agreement with the Canadian Council on Animal Care guidelines and was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Université de Montréal.

Drugs and implants

An injectable solution of enrofloxacin (Baytril; Bayer, Toronto, Ontario), 100 mg/mL, was used for EFX administration. The EFX-loaded PMMA implants were prepared in a sterile fashion by adding 6 g of EFX powder (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) to 40 g of powdered polymer (Surgical Simplex P Radiopaque Bone Cement; Howmedica, Limerick, Ireland). The combination was homogenized, the liquid monomer was added, and the soft EFX-PMMA mixture was poured into 3-mL syringe barrels. Plungers were then inserted and depressed to the 0.7 mL mark to expel air and excess cement (27). The cement in the syringe was allowed to harden to produce 500 mg cylindrical EFX-PMMA implants that were 9 mm in diameter, 7 mm long, and contained ~65 mg EFX.

Experimental procedures

On day 7, pigs received IM injections of azaperone (2 mg/kg body weight (BW)), ketamine (8 mg/kg BW), and hydromorphone (0.1 mg/kg BW). Anaesthesia was induced using a face mask delivering 1–3% isoflurane in 100% O₂, and then continued via an endotracheal tube. No antibiotic prophylaxis was applied because this would interfere with the study's objective. An indwelling catheter was placed in the left external jugular vein for serial blood collection. In the LD group, the lateral aspect of the left femur was approached to place 7 peri-diaphyseal EFX-PMMA implants/10 kg BW.

From days 7 to 21, pigs in the IM group received IM injections of EFX at a dose of 5 mg/kg BW, q24h, adjusted twice a week based on increase in body weight. Pigs in the LD group received no other antibiotic after their peri-femoral EFX-PMMA implants.

In all pigs, blood was collected in EDTA tubes on 8 occasions during the first 32 h of treatment (from day 7 to day 8), and then was collected once daily between days 9 and 21, before the morning EFX IM injections. Plasma was harvested after centrifugation and stored at -70°C pending analysis.

Fecal samples (20 g) were collected once daily from fresh feces or rectally. Samples taken between days 1 and 6 were used to determine the baseline conditions, and samples taken between days 7 and 21 were used to document the time-course of the *E. coli* population size and antibiotic susceptibility of isolates during exposure to EFX. After collection, all samples were kept at 4°C until homogenized and plated (within the next 6 h).

At day 21, all pigs were euthanized by barbiturate overdose injected intravenously. For practical reasons, experiments were

divided into 2 separate time blocks, such that 2 subgroups of 3 or 4 pigs from each treatment group were studied simultaneously.

Plasma enrofloxacin and ciprofloxacin concentrations

A liquid chromatography, electrospray-tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS) method was developed to measure the plasma concentrations of EFX and its active metabolite ciprofloxacin (CFX) simultaneously. Briefly, the EFX and CFX were extracted by protein precipitation from plasma. One hundred microliters of plasma sample were mixed with 500 μ L of acetonitrile fortified with 250 ng/mL of reserpine (internal standard). The samples were centrifuged at 12 000 g for 10 min and 10 μ L of supernatant was injected into the HPLC system, fitted with a Waters Symmetry C18 150 \times 3.9 mm column (3.5 μ m particle size). The mobile phase was a 80:20 mixture of acetonitrile and 0.5% formic acid in water and the flow rate was 0.8 mL/min. The analytes were measured by mass spectrometry using a PE Scienc API 3+ instrument equipped with an electrospray ion source (ESI). The analyte responses were measured in selected reaction monitoring mode (SRM) using mass transitions of m/z 360 \rightarrow 316 (EFX), m/z 332 \rightarrow 245 (CFX), and m/z 609 \rightarrow 174 (reserpine). The quantification was based on the peak-area ratios of each analyte with the internal standard, and the calibration curve was constructed using a linear regression model (weighted 1/concentration). The lower limit of detection of the method was 2 μ g/L for both analytes, with overall accuracies and precisions of 100.3%, 10.5% for EFX and 98.7%, 8.4% for CFX.

Microbiological analyses

The daily fecal *Escherichia coli* counts were performed according to standard procedures on MacConkey agar. For each sample, 20 g of feces were homogenized in a sterile bag by hand mixing for 1 min, and 5 g were diluted in sterile saline (1:10). The direct plating method (DPM) for detection of antimicrobial-resistant *E. coli* was carried out (28). Each dilution (100 μ L) was plated onto a MacConkey Agar plate (Quelab Laboratories, Montreal, Quebec) to yield isolated colonies. Bacterial growth was examined after overnight incubation at 37°C for lactose-fermenting colonies with a morphological appearance typical of *E. coli*. For each fecal sample, 3 such colonies were selected at random and purified on 5% sheep blood agar (Quelab Laboratories) and confirmed with triple iron sugar agar, citrate agar, indole and urease tests (29). One out of 10 isolates with atypical morphology or with typical biochemical patterns of *E. coli* was further characterized on API20E galleries (Biomérieux, Hazelwood, Missouri, USA) (30). The antimicrobial susceptibility of *E. coli* isolates was determined using the disk diffusion method, standardized according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (31). The following antibiotics were used: EFX, CFX, nalidixic acid, ceftiofur, amoxicillin, ampicillin, streptomycin, gentamicin, apramycin, trimethoprim-sulfamethoxazole (TMS), florfenicol, and tetracycline. After overnight incubation at 37°C for 16 to 18 h, the inhibition zone diameters (mm) of each antibiotic were measured using a standard ruler.

Pharmacokinetic and statistical analyses

The time-course of plasma EFX and CFX concentrations in pigs dosed IM or with the LDDS were subject to statistical moment PK

analyses using WinNonlin 5.1 standard edition (Pharsight, Palo Alto, California, USA) (32). The linear trapezoid algorithm was applied to estimate the areas under the concentration (AUC) and first moment curves (AUMC) associated with the first IM dosing, and with the LDDS implantation. Extrapolation to infinity of AUC and AUMC was performed with standard formulas after estimation of the terminal decay slope (λ_z). The following PK parameters were calculated: apparent systemic clearance (CL/F) and volume of distribution (V/F), mean residence time (MRT), and half-life of the terminal decay slope ($t_{1/2} - \lambda_z$). In addition, the overall systemic exposure to EFX and CFX was estimated with the measured AUC for the whole study period.

Statistical analyses were performed with the SAS system, version 9.1 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA), using the 0.05 level of significance for all analyses. All daily fecal *E. coli* counts were log₁₀ transformed to normalize their distributions and include in the analysis. In each pig, 1 to 4 samples were randomly chosen per period for susceptibility testing, depending on the duration of each period and the presence of recovered colonies. Three colonies were tested per sample and averaged. Inhibition zone diameters were also log₁₀ transformed, and the assumptions of normality necessary to perform a parametric analysis were fulfilled. The data are still presented without transformation [mean and (S_x)] in the text or figures. Accounting for the diameter of the antimicrobial disks, the minimal value for reported inhibition zone diameter was 6 mm. The time-course of the size of *E. coli* population and the antibiotic susceptibility of their isolates was divided in 4 periods, based on the observed fecal *E. coli* counts: (1) baseline, days 1 to 6, (2) antibiotic first exposure effect, day 7 to time of undetectable bacterial count, (3) bactericidal equilibrium, duration of undetectable bacterial counts, and (4) regrowth equilibrium, time of bacterial resurgence to day 21. The effect of EFX dosing route on the duration of periods 2 and 3 was assessed with a survival analysis, using the log-rank test at the 0.05 α -level to focus on the late differences in *E. coli* recovery (33). Linear mixed-effect models for repeated measures, with time periods 1, 2, and 4 as a within-subject factor, treatment as a between-subject factor, and pig within treatment as random variable, were used to assess the changes in *E. coli* count and inhibition diameters over time. The time \times treatment interaction was also assessed as a fixed effect. Afterwards, least-square means were used to examine differences in the time-course of the size of the bacterial population and of the inhibition zone diameters, as well as the differences recorded for each treatment group. Results are presented as least-square means \pm standard errors unless otherwise specified. Pearson correlation coefficients were determined between antimicrobials.

Results

Pigs gained 6.57 ± 2.85 kg during the experiment and none demonstrated any major systemic or local adverse reactions.

Plasma enrofloxacin and ciprofloxacin concentrations

Mean plasma EFX and CFX concentrations in groups LD and IM are presented in Figure 1, and selected PK parameters are presented in Table I. Plasma EFX concentrations in LD pigs were on average

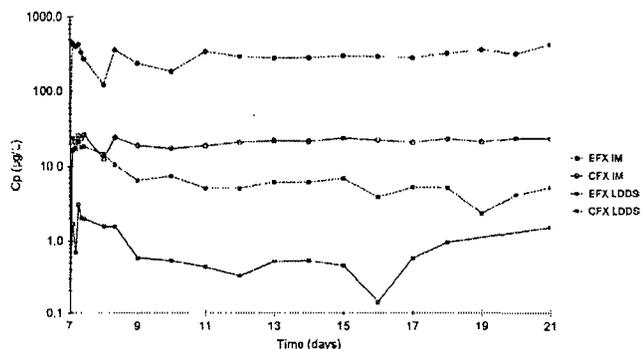


Figure 1. Mean plasma enrofloxacin and ciprofloxacin concentrations in IM and LD pigs.

4.5% as high as those in IM pigs, and plasma CFX concentrations were on average 8.5% as high as those of EFX in each treatment group. Plasma EFX concentration peaked at similar times in both treatment groups, but its decay in LD pigs was clearly biphasic, with a sharp decrease during the 2 d following t_{max} , and a slope with 8.76-day half-life that lasted for the rest of the experiment (Table I). In both treatment groups, the time-course of plasma CFX concentrations was similar to that of EFX but the plasma CFX concentrations below the quantification limit in some LD pigs.

Fecal *Escherichia coli* counts

The course of fecal *E. coli* counts is depicted in Figure 2. During the baseline period (from days 1 to 6), this bacterial population averaged $10^{3.79} \pm 10^{0.42}$ and $10^{5.55} \pm 10^{0.42}$ CFU/g in LD and IM pigs, respectively, which was significantly different ($P = 0.019$). The administration of EFX, either intramuscularly (IM) or locally (LD), markedly reduced the size of the fecal *E. coli* population during the next 2 days (first exposure effect period), resulting at its end in counts below the limit of detection of 100 CFU/g. The duration of the first effect period was not significantly different between groups IM and LD (2.43 ± 0.48 d and 1.71 ± 0.18 d, respectively, survival analysis $P = 0.17$). However, the duration of the bactericidal equilibrium in LD pigs was significantly less than in IM pigs: 4.57 ± 0.72 d versus 8 ± 1.66 d, respectively (survival analysis, $P = 0.037$). Finally, the fecal *E. coli* counts during the days of the regrowth equilibrium period were lower (but not significantly lower) than those of baseline values in group IM ($P = 0.0837$), and almost reached pre-treatment levels in group LD ($P = 0.1116$). Though not statistically significant, the number of pigs per group for which bacterial counts remained below the detection level during the entire experiment differed between group LD (0/7 pigs) and IM (3/7 pigs).

Escherichia coli susceptibility to EFX simultaneously

The results of fecal *E. coli* isolates susceptibility to EFX, as estimated from growth inhibition zone diameters, are presented in Figure 3. Significant effects of the groups and time periods were identified ($P < 0.001$). In group LD, susceptibilities during period 2 were not significantly different from baseline values (35.4 ± 1.1 mm, $P = 0.6474$), but reached statistical significance in period 4 ($P = 0.05$). However, the isolates remained susceptible to EFX according to

CLSI guidelines. In group IM, EFX susceptibility in period 2 was not statistically different from baseline (35.2 ± 1.1 mm; $P = 0.494$), but dropped dramatically during period 4 ($P < 0.0001$). The *E. coli* isolates recovered from IM pigs during the regrowth phase were resistant to EFX. The significant time \times treatment interaction on the susceptibility of *E. coli* isolates to EFX was restricted to period 4 ($P < 0.0001$).

Escherichia coli susceptibility to other quinolones

The results of fecal *E. coli* isolates susceptibility to CFX and nalidixic acid were similar to those described for EFX for both groups. Significant effects of treatment, time, and treatment \times time were recorded ($P < 0.0001$ for both drugs). Compared with baseline values, the susceptibility of *E. coli* isolates to CFX and nalidixic acid in the LD pigs experienced no significant variation at period 2 ($P > 0.78$), but significant decreases were recorded at period 4 ($P \leq 0.025$). The average inhibition zone diameters of CFX and nalidixic acid for the latter isolates, however, were still > 21 mm and > 18 mm, respectively, indicating that they were still susceptible. Similar findings were recorded for IM pigs: baseline inhibition zone diameters were 38 ± 1.1 mm for CFX and 26.4 ± 1.1 mm for nalidixic acid, within-group differences for period 2 were not statistically significant ($P \geq 0.352$), but significant decreases were recorded at period 4 (7 ± 1.1 mm and 7 ± 1.1 mm respectively, with $P < 0.0001$ for both). The statistically significant time \times treatment interaction was limited to inhibition zone diameter differences for the regrowth period ($P < 0.0001$). Pearson correlation coefficients were excellent among all 3 fluoroquinolones tested: 0.98 between EFX and CFX, 0.96 between EFX and nalidixic acid, and 0.95 between CFX and nalidixic acid.

Escherichia coli susceptibility to other antibiotics

The results of fecal *E. coli* isolates susceptibility to amoxicillin and ampicillin are presented in Figures 4 and 5, respectively. Susceptibility for amoxicillin and ampicillin were subject to a significant time effect ($P = 0.0207$ and $P \leq 0.0003$, respectively). In the LD and IM pigs, no significant difference in amoxicillin inhibition zone diameters was recorded for exposure periods 1, 2, and 4 ($P > 0.1313$ and $P > 0.0611$, respectively). In contrast, ampicillin susceptibility of *E. coli* isolates recovered from IM pigs decreased at period 4 ($P < 0.0005$) while ampicillin inhibition zone diameters from LD pigs decreased slightly, but significantly, during period 4 compared with period 2 ($P = 0.0357$). Pearson correlation coefficients were 0.29 between EFX and amoxicillin, and 0.56 between EFX and ampicillin.

The results of fecal *E. coli* isolates susceptibility to TMS are presented in Figure 6. Treatment, time and treatment \times time effects were also found for TMS ($P < 0.02$). Inhibition zone diameters for the *E. coli* isolates recovered from period 4 were significantly smaller than those of isolates from period 1 ($P = 0.0412$ for LD and $P = 0.0003$ for IM), and the difference between periods 2 and 4 was significant for IM pigs ($P = 0.0016$). The treatment \times time interaction was limited to period 4, where isolates from LD pigs had inhibition zone diameters close to baseline values, as opposed to those from IM pigs, in which inhibition zone diameters were mostly less than baseline values ($P < 0.0023$). Pearson correlation coefficient between EFX and TMS was 0.78.

Table 1. Selected pharmacokinetic parameters in groups LD and IM

Parameter	Units	Enrofloxacin		Ciprofloxacin	
		LD	IM	LD	IM
AUC _{0-24 h}	h · (µg/L)	—	6344 ± 3625		451.8 ± 239.4
AUC _{0-336 h}	h · (µg/L)	2100 ± 229	90079 ± 51277		
λ _z ^a	/h	0.005 ± 0.003	0.081 ± 0.046		
C _{max}	µg/L	26.4 ± 2.5	499.7 ± 348.6	5.1 ± 3.5	27.5 ± 6.6
t _{max} ^a	h	3.4 ± 1.9	3.3 ± 2.1	13.3 ± 11.9	8.3 ± 2.0
MRT	h	301.28 ± 100.79	19.38 ± 5.96		
t _{1/2} - λ _z ^b	h	210.16	11.97		
CL/F	L/(h · kg)	0.0017 ± 0.0003	0.0007 ± 0.0003		
V/F	L/kg	0.514 ± 0.065	0.015 ± 0.012		

^a Normal distribution.

^b Harmonic mean and jackknife estimate of standard deviation.

AUC_{0-24h} — Area under the curve for the first 24 h; AUC_{0-336h} — Area under the curve for the entire project; λ_z — terminal decay slope; C_{max} — maximal concentration; t_{max} — time to C_{max}; MRT — mean residence time; CL/F — apparent systemic clearance; V/F — volume of distribution.

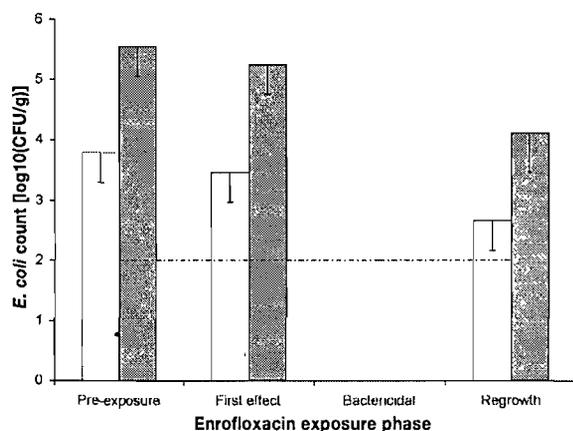


Figure 2. Evolution of the faecal *Escherichia coli* population size (least-square means, and standard errors).

LOD — lower limit of bacterial detection.

a, b — least-square means with different superscripts significantly differ

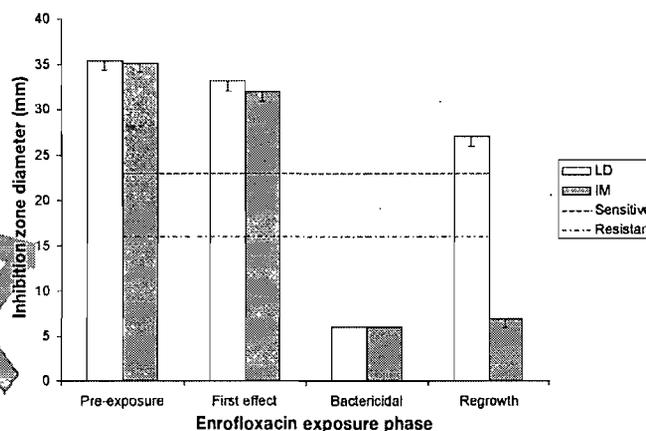


Figure 3. Evolution of *Escherichia coli* susceptibility to enrofloxacin (least-square means, and standard errors).

a, b, c — least-square means with different superscripts or subscripts significantly differ (statistical analysis was performed on log transformed values)

Susceptibility to ceftiofur, gentamicin, streptomycin, tetracycline, apramycin, and florfenicol were also tested, and no significant variations were observed for these antibiotics. Excellent Pearson correlation coefficients were found between amoxicillin and ceftiofur (0.87) or ampicillin (0.86).

Discussion

During the last decades, LDDS have gained popularity in the prophylaxis and treatment of human and animal osteomyelitis and infected articular prosthesis. However, there has been more and more concern about their ability to select antibiotic resistance in pathogenic bacteria (13–17), a problem that is favoured by the production of biofilms on the surface of surgical implants (18–20,34).

The focus in this study was on the effect of prolonged low systemic antibiotic concentrations following a LDDS implantation on the *E. coli* population from the commensal fecal flora, which to our knowledge has never been investigated.

Our LDDS was designed to achieve 2 objectives: 1) to achieve low systemic antibiotic concentrations over a prolonged period of time, and 2) to mimic clinical situations where, most of the time, clinicians design and shape their own LDDS implants according to bacterial susceptibility and room available for implantation. Enrofloxacin and PMMA are clinically relevant choices for this purpose: EFX is a fluoroquinolone efficient against staphylococci and Gram-negative bacteria, which are the main infectious agents implicated in post-traumatic osteomyelitis; PMMA is still considered the LDDS matrix gold standard until an affordable and convenient resorbable matrix becomes available (1,3,35–37). Moreover, low serum EFX concentrations were measured throughout the study with our EFX-PMMA LDDS, similar to most LDDS described in the literature (35,37). It is known that the material used as a matrix, the shape, porosity and volume of the implants, as well as the nature and concentration of the chosen antibiotic all influence the elution properties of LDDS (5,6,27,38–40). The plasma EFX concentrations measured after implantation typically followed a biphasic pattern with a quick

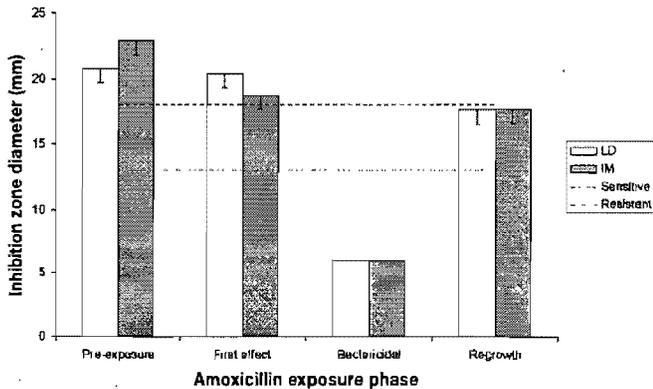


Figure 4. Evolution of *Escherichia coli* susceptibility to amoxicillin — least-square means and standard errors (statistical analysis was performed on log transformed values).

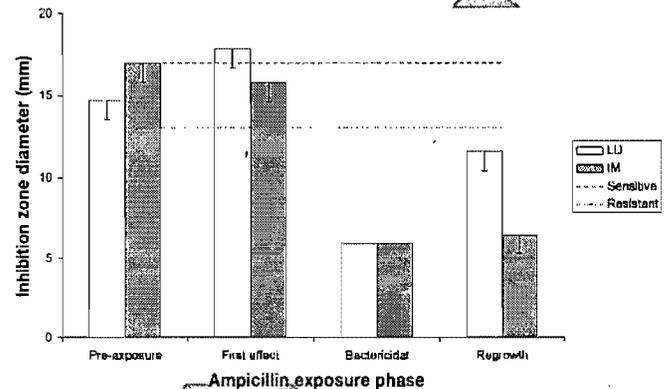


Figure 5. Evolution of *Escherichia coli* susceptibility to ampicillin (least-square means, and standard errors).

a,b,c — least-square means with different superscripts or subscripts significantly differ (statistical analysis was performed on log transformed values)

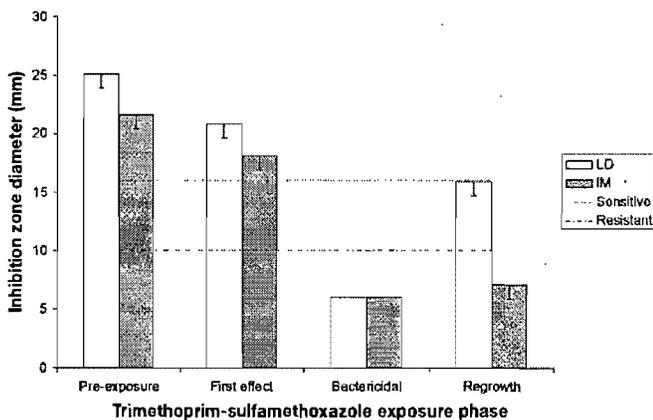


Figure 6. Evolution of *Escherichia coli* susceptibility to trimethoprim-sulfamethoxazole — least-square means, and standard errors.

a,b,c,d — least-square means with different superscripts or subscripts significantly differ (statistical analysis was performed on log transformed values)

release during the first 24 h, likely resulting from solvation of the fraction of antibiotic that is loosely adhered to the implant surface. Afterwards, elution from deeper layers may have sustained the plasma EFX concentration. In vitro and local in vivo elution studies and microscopic porosity evaluation could have been performed to 1) more precisely describe the characteristics of our EFX-PMMA LDDS, and 2) verify that our LDDS was providing higher concentrations at the site of interest than the IM route for the treatment duration. Various studies have reported systemic or local in vivo elution characteristics of different LDDS and have compared them to local concentrations obtained by systemic antibiotic administration (6,38,40). Adams et al (6) reported good granulation tissue and bone CFX concentrations (above break point sensitivity level) 28 d after peri-tibial implantation of CFX impregnated PMMA beads (6 g CFX/40 g PMMA powder).

Resistance to fluoroquinolones can occur mainly by 3 mechanisms: 1) decreased permeability of the bacterial cell wall caused by

alterations of the hydrophilic pores (outer membrane proteins), 2) an efflux pump, which actively transports the fluoroquinolone molecule out of the cell as it approaches or passes through the bacterial membrane, and 3) mutations in the genes encoding the GyrA and GyrB enzyme subunits of DNA gyrase and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV, thus altering the quinolone molecule's binding site (14,35,41,42). The genetic determinants associated with our recorded changes in antibiotic susceptibility patterns will be reported in a separate communication. For resistant mutants to develop in the environment, favorable events like an exposition of the bacterial population to sub-bactericidal concentrations of the incriminated antibiotic, a sufficient energy metabolism to support a plasmid acquisition and a positive biologic balance of a mutation, or both, are required, among other possibilities. The mutant selection window (MSW) is an antimicrobial concentration range extending from the minimal concentration required to block the growth of wild-type bacteria up to that required to inhibit the growth of the least susceptible, single-step mutant (7,8). It has been demonstrated that placing antimicrobial concentrations inside the MSW enriches resistant mutant subpopulations selectively, whereas placing concentrations above the upper boundary of the window, also called the mutant prevention concentration, restricts selective enrichment (7,8). We observed a temporary but significant first antibiotic exposure effect of our LDDS on the total *E. coli* count from the 2nd to the 4th day post-implantation. This effect could be explained by the EFX peak release ($26.4 \pm 2.5 \mu\text{g/L}$) reached in the first 3 to 4 h, which is near the *E. coli* minimum inhibitory concentration (MIC) ($30\text{--}125 \mu\text{g/L}$) (35). Through intestinal excretion of EFX via P-glycoproteins, this initial burst effect could have had a temporary impact on the fecal flora. However, only a slight change in EFX isolates susceptibility of the *E. coli* population was observed after implantation of the LDDS. This could be explained by the very short duration of the systemic peak EFX concentration following LDDS implantation, presumably not enough to allow a sustained selection. Although a slight decrease in susceptibility was observed during the period of bactericidal equilibrium, it stayed largely above the "intermediate" sensitivity threshold. Even if this may not seem clinically relevant,

these results demonstrate that a change in the *E. coli* isolates EFX susceptibility did occur, and that the use of a LDDS should be well justified, especially for prophylaxis where excessive usage happens more often.

In contrast, the susceptible *E. coli* population was completely replaced by presumably highly resistant variants during IM administration of EFX. This result was expected, and was in agreement with those of Wiuff et al (43). The EFX resistant *E. coli* isolates were most likely selected from pre-existing mutants initially present in low frequencies (43). This would mean that IM administration of 5 mg/kg BW EFX led, for some of the pigs, to fecal concentrations above the MSW (the 3 pigs for which the *E. coli* population was completely and durably depleted), whereas for others it presumably led to concentrations inside the MSW (the 4 pigs for which the *E. coli* isolates population recovered with resistant strains) (9–11). Although a mild decrease in susceptibility to various antibiotics was found after the use of our LDDS, this change was dramatically more important during the IM administration of EFX. For similar or better efficacy for treating severe bone infections, where antibiotics are mandatory, LDDS seem to be more advantageous than the IM route of administration for the antimicrobial resistance selection of resident microflora (2,4,37). Furthermore, based on comparisons of resistance selection between the IM and oral administrations of EFX previously published, this may also be more advantageous than the oral route of administration (43). All pigs were euthanized at the end of the study, preventing any follow-up of the susceptibility pattern of the *E. coli* population after stopping EFX IM administration. However, this has been studied by Wiuff et al (43) who reported that the resistant phenotype of fecal *E. coli* would persist and predominate for at least 2 wk or even longer after only 3 consecutive days of oral or IM EFX administration.

It is known that resistance to 1 quinolone frequently results in resistance to all (35), as seen in our study with CFX and nalidixic acid. However, some significant variations of *E. coli* susceptibility to other classes of antibiotics tested during EFX administration were observed. Some mutations that confer resistance to the fluoroquinolones, via alterations in permeability or activation of the efflux pump can confer resistance to other antimicrobial agents; however, previously reported "cross-resistances" during fluoroquinolone administration concerned the cephalosporins and tetracyclines (35). To our knowledge, this is the first report of ampicillin and TMS resistance development induced by the administration of EFX. As previously reported, the mechanisms implicated in these "cross-resistances" could potentially concern the *marRAB* regulon, responsible for the number of porines in the external membrane or the AcrAB-TolC efflux pump system in the cytoplasmic membrane (41). We were surprised by the discrepancies of bacterial susceptibilities between amoxicillin and ampicillin during period 4, as these 2 antibiotics belong in the same class and are often used interchangeably. Although this could potentially result from a type α statistical error, it could also be explained by a difference in their respective affinity for the previously mentioned porines or efflux pump. Another hypothesis could be that, in fluoroquinolone-resistant mutants, modification of penicillin-binding protein (PBP) with reduced drug affinity or reduced bacterial permeability has occurred (44). Given the different affinities for PBPs between ampicillin (PBPs 2 and 3)

and amoxicillin (PBPs 1A and 2), modification of one particular PBP could theoretically affect bacterial susceptibility for one penicillin but not the other (45). However, these hypotheses need to be confirmed. Our next communication will report the precise nature of the mutations involved in the mechanism of resistance to assess their relative location/interactions with those involved in resistance against fluoroquinolones.

The IM and local administration of EFX logically resulted in a marked difference in the systemic exposure to this antibiotic and its metabolite CFX, as estimated by the area under the curve (AUC; Figure 1, Table I). This resulted in a difference in the exposure of the fecal flora to both EFX and CFX, but because none of these drugs was administered intravenously, it is not possible at this stage to assess their absorption, metabolism, and disposition pharmacokinetics, or their respective contributions to the selection of fecal resistant bacteria. However, it was felt that having a "clinical-based" model with different overall EFX doses (which is inherent to the specific mode of action of the LDDS and its administration route) would be more representative and clinically relevant than a "pharmacological-based" model where both IM and local overall doses would have been equal. Moreover, the dosing regimens herein revealed that the mutant selection window has a lower boundary *in vivo*, both in terms of amount and duration of drug exposure. A negative control group was not used in our experimental design because the rate of fluoroquinolone resistance mutation in *E. coli* was expected to be low in group LDDS and not detectable in the absence of selection pressure. Moreover, given the highly controlled environment of the pigs during the study (room temperature and humidity, light cycle, disinfection procedure, etc.) we felt that having each individual being its own negative control would be valuable and more accurate. Since the difference in baseline *E. coli* counts between both groups was statistically significant, a higher probability of mutation could have theoretically biased group IM and affected our results. Genetic mutations responsible for antimicrobial resistance, however, are random events occurring at very low frequencies (10^{-6} to 10^{-10} for the fluoroquinolones), which suggests that the risk of bias in our study was negligible (46). Finally, we are aware that conclusions regarding the rate of exposure of fecal *E. coli* to EFX and CFX produced with our implants are difficult to transpose to other LDDS. As previously mentioned, each combination of antibiotic and matrix presents specific elution properties that may vary greatly, and additionally be subject to host effects. Moreover, fluoroquinolone resistance usually occurs through stepwise accumulation of point mutations, which is quite different from most other resistances mainly caused by one-step acquisition of a resistance gene (14,35,41,42). Future research is warranted on other antibiotic/matrix associations to confirm our observations and increase our understanding of this topic.

This study evaluated, for the first time, the development of antibiotic resistance in *E. coli* isolates from the commensal flora, indicator micro-organism and potential reservoir of genes of resistance, following the use of a LDDS. We showed that the implantation of EFX-loaded PMMA implants has minimal potential to select for antimicrobial resistance within the studied fecal *E. coli* isolates in a swine model. Although implantation of our LDDS led to a temporary decrease in the total count of the fecal *E. coli* population, the intestines were rapidly recolonized by a population of *E. coli* with a

very slightly decreased antimicrobial susceptibility pattern. Even if the changes in susceptibility were minor, this finding dictates proper justification of LDDS usage for prophylaxis. Also, the largely inferior variations in susceptibility for group LD versus IM could represent another advantage of LDDS usage compared to long-lasting systemic administration of fluoroquinolones. Finally, further studies implying other antibiotic-matrix combinations and flora would be interesting to complement our observations.

Acknowledgments

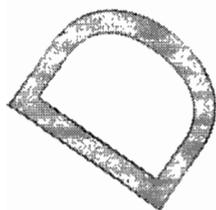
This study was supported by Santé Canada and the Fondation du XXIII^e Congrès Mondial Vétérinaire.

We wish to thank Guy Beauchamp for assistance in the statistical tests, Mrs. Marianne Turgeon-Plouffe and Valérie Normand for technical assistance, and the Laboratoire d'Hygiène Vétérinaire et Alimentaire (Agriculture et Agro-alimentaire Canada, St-Hyacinthe) for use of their animal research facilities.

References

- Kanellakopoulou K, Giamarellos-Bourboulis EJ. Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs* 2000;59:1223-1232.
- Streppa HK, Singer MJ, Budsberg SC. Applications of local antimicrobial delivery systems in veterinary medicine. *J Am Vet Med Assoc* 2001;219:40-48.
- Braden TD. Posttraumatic osteomyelitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1991;21:781-811.
- Mader JT, Ortiz M, Calhoun JH. Update on the diagnosis and management of osteomyelitis. *Clin Podiatr Med Surg* 1996;13:701-724.
- Henry SL, Galloway KP. Local antibacterial therapy for the management of orthopaedic infections. Pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 1995;29:36-45.
- Adams K, Couch L, Cierny G, Calhoun J, Mader JT. In vitro and in vivo evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate beads. *Clin Orthop Relat Res* 1992;278:244-252.
- Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:11-17.
- Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: A general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis* 2001;33 Suppl 3:S147-S156.
- Linde HJ, Lehn N. Mutant prevention concentration of nalidixic acid, ciprofloxacin, clinafloxacin, levofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, sparfloxacin or trovafloxacin for *Escherichia coli* under different growth conditions. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:252-257.
- Olofsson SK, Marcusson LL, Komp Lindgren P, Hughes D, Cars O. Selection of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* in an in vitro kinetic model: Relation between drug exposure and mutant prevention concentration. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:1116-1121.
- Pasquali F, Manfreda G. Mutant prevention concentration of ciprofloxacin and enrofloxacin against *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Pseudomonas aeruginosa*. *Vet Microbiol* 2007;119:304-310.
- Cavet ME, West M, Simmons NL. Fluoroquinolone (ciprofloxacin) secretion by human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Br J Pharmacol* 1997;121:1567-1578.
- Sanzen L, Walder M. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci in an orthopaedic department. *J Hosp Infect* 1988;12:103-108.
- Weber FA, Lautenbach EE. Revision of infected total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 1986;211:108-115.
- Kendall RW, Duncan CP, Smith JA, Ngui-Yen JH. Persistence of bacteria on antibiotic loaded acrylic depots. A reason for caution. *Clin Orthop Relat Res* 1996;329:273-280.
- Thomes B, Murray P, Bouchier-Hayes D. Development of resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* on gentamicin-loaded bone cement in vivo. *J Bone Joint Surg Br* 2002;84:758-760.
- van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review. *Acta Orthop Scand* 2001;72:557-571.
- Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Effects on antibiotic resistance of *Staphylococcus epidermidis* following adhesion to polymethylmethacrylate and to silicone surfaces. *Biomaterials* 2002;23:1495-1502.
- Arizono T, Oga M, Sugioka Y. Increased resistance of bacteria after adherence to polymethyl methacrylate. An in vitro study. *Acta Orthop Scand* 1992;63:661-664.
- Naylor PT, Myrvik QN, Gristina A. Antibiotic resistance of biomaterial-adherent coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. *Clin Orthop Relat Res* 1990;261:126-133.
- Sorum H, Sunde M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet Res* 2001;32:227-241.
- Gustafsson I, Sjolund M, Torell E, et al. Bacteria with increased mutation frequency and antibiotic resistance are enriched in the commensal flora of patients with high antibiotic usage. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:645-650.
- Amyes SG, Tait S, Thomson CJ, et al. The incidence of antibiotic resistance in aerobic faecal flora in south India. *J Antimicrob Chemother* 1992;29:415-425.
- Shanahan PM, Wylie BA, Adrian PV, Koornhof HJ, Thomson CJ, Amyes SG. The prevalence of antimicrobial resistance in human faecal flora in South Africa. *Epidemiol Infect* 1993;111:221-228.
- Sunde M, Fossum K, Solberg A, Sørnum H. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb Drug Resist* 1998;4:289-299.
- Thomson CJ. The global epidemiology of resistance to ciprofloxacin and the changing nature of antibiotic resistance: A 10-year perspective. *J Antimicrob Chemother* 1999;43 Suppl A:31-40.
- Ethell MT, Bennett RA, Brown MP, Merritt K, Davidson JS, Tran T. In vitro elution of gentamicin, amikacin, and ceftiofur from polymethylmethacrylate and hydroxyapatite cement. *Vet Surg* 2000;29:375-382.
- Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A, Dell'Amico E, Roselli M, Strohmeier M, et al. High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy antimicrobial consumption. *J Infect Dis* 2004;189:1291-1294.

29. Lidin-Janson G, Kaijser B, Lincoln K, Olling S, Wedel H. The homogeneity of the faecal coliform flora of normal school-girls, characterized by serological and biochemical properties. *Med Microbiol Immunol* 1978;164:247-253.
30. Kronvall G, Larsson M, Borén C, et al. Extended antimicrobial resistance screening of the dominant faecal *Escherichia coli* and of rare resistant clones. *Int J Antimicrob Agents* 2005;26:473-478.
31. National Committee for Clinical Laboratory Standards. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests of Bacteria Isolated from Animals; approved standard M31-S1. Villanova, Pennsylvania, 2004.
32. Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Statistical moments in pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm* 1978;6:547-558.
33. SAS Online doc® 9.1.3. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA [page on the Internet] Available from http://support.sas.com/documentation/onlinedoc/91pdf/index_913.html Last accessed May 10, 2008.
34. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 2002;66:86-92.
35. Walker RD. Fluoroquinolones. In: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, eds. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 3rd ed. Ames, Iowa: Iowa State Univ Pr, 2000:315-338.
36. Cariou M, Boulouis HJ, Moissonnier P. Inclusion of marbofloxacin in PMMA orthopaedic cement: An in vitro experimental study. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2006;19:106-109.
37. Huneault LM, Lussier B, Dubreuil P, Chouinard L, Désévaux C. Prevention and treatment of experimental osteomyelitis in dogs with ciprofloxacin-loaded crosslinked high amylose starch implants. *J Orthop Res* 2004;22:1351-1357.
38. DiMaio FR, O'Halloran JJ, Quale JM. In vitro elution of ciprofloxacin from polymethylmethacrylate cement beads. *J Orthop Res* 1994;12:79-82.
39. Ramos JR, Howard RD, Pleasant RS, et al. Elution of metronidazole and gentamicin from polymethylmethacrylate beads. *Vet Surg* 2003;32:251-261.
40. Anguita-Alonso P, Rouse MS, Piper KE, Jacofsky DJ, Osmon DR, Patel R. Comparative study of antimicrobial release kinetics from polymethylmethacrylate. *Clin Orthop Relat Res* 2006;445:239-244.
41. Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat* 1999;2:38-55.
42. Piddock LJ. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: An update 1994-1998. *Drugs* 1999;58 Suppl 2:11-18.
43. Wiuff C, Lykkesfeldt J, Svendsen O, Aarestrup FM. The effects of oral and intramuscular administration and dose escalation of enrofloxacin on the selection of quinolone resistance among *Salmonella* and coliforms in pigs. *Res Vet Sci* 2003;75:185-193.
44. Prescott JF. Beta-lactam antibiotics: Penam penicillins. In: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, eds. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 3rd ed. Ames, Iowa: Iowa State Univ Pr, 2000:105-133.
45. van Heijenoort J. Mécanismes moléculaires de la bactéricidie: Beta-lactamines. In: Courvalin P, Drugeon H, Flandrois J-P, Goldstein F, eds. *Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques*. Paris, France: Editions Maloine, 1990:13-22.
46. Acar JF, Goldstein FW. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 1997;24 Suppl 1:S67-S73.



Chapitre quatrième

AUTRES RÉSULTATS

1. Généralités

Deux porcs du groupe O sont morts durant la chirurgie suite à des complications anesthésiques d'ordre respiratoire. Le nombre d'individus par groupe était donc de 7 dans les groupes L et M et 5 dans le groupe O. Tous les porcs ont présenté un bon état général durant la durée de l'étude. Du kétoprofène a été généralement administré durant les trois premiers jours post-opératoires sur la base des scores de douleur. Aucun effet secondaire systémique ou local lié à l'administration d'EFX n'a été observé.

Les résultats pour les groupes L et M ayant été rapportés dans la publication au Canadian Journal of Veterinary Research, seuls ceux du groupe O seront ici présentés.

2. Concentrations plasmatiques en enrofloxacin et ciprofloxacin

Les concentrations plasmatiques maximales en EFX ont été obtenues à des temps similaires dans les trois groupes (**Figure 9**). Les schémas d'administration quotidienne par voie IM et PO ont permis l'atteinte un niveau d'exposition plasmatique à l'EFX stationnaire, avec une légère accumulation par rapport à la première dose (% accumulation = $1/(1-e^{-\lambda z^* \tau}) \approx 130\%$ pour une administration quotidienne, si l'on applique les valeurs de demi-vie du **Tableau IV**). Les concentrations plasmatiques d'EFX associées à la voie locale sont environ 10 fois moindres que celles des deux autres voies, qui donnent des profils similaires.

Les mêmes observations peuvent être rapportées pour les concentrations de CFX (**Figure 10**) sauf pour ce qui est de l'accumulation : nous n'avons pas administré de CFX parentérale, donc nous ne savons pas si la demi-vie apparente est déterminée par l'excrétion de CFX ou par le taux de conversion métabolique d'EFX en CFX. Le ratio des AUC de CFX sur EFX qui témoigne du métabolisme de cette dernière est d'environ 5% pour la voie orale, ce qui est comparable aux voies locale et IM (environ 8,5%).

Figure 9 : Courbes des concentrations plasmatiques moyennes en enrofloxacin obtenues dans les groupes L, M et O.

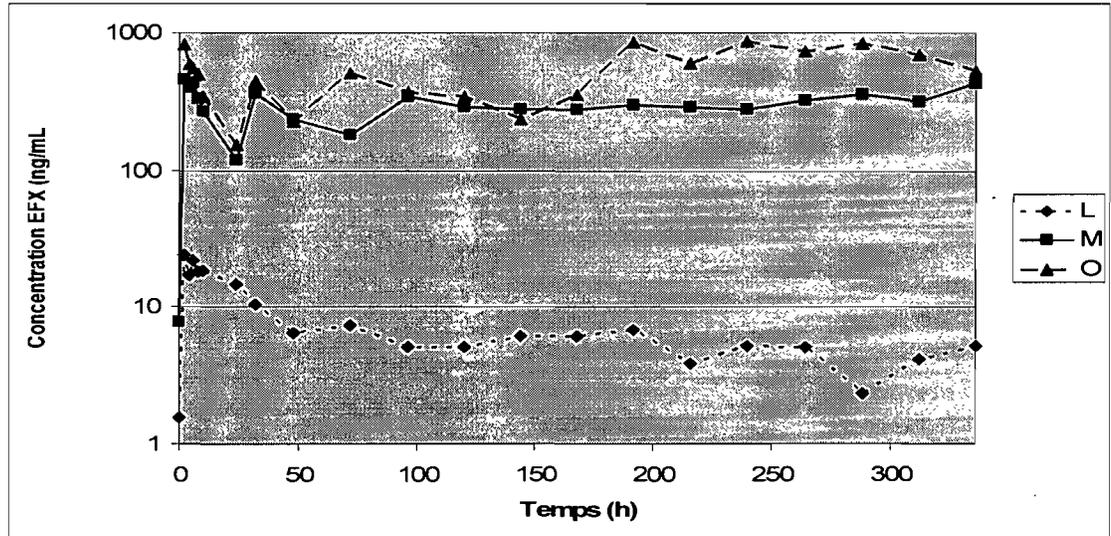


Figure 10 : Courbes des concentrations plasmatiques moyennes en ciprofloxacine obtenues dans les groupes L, M et O.

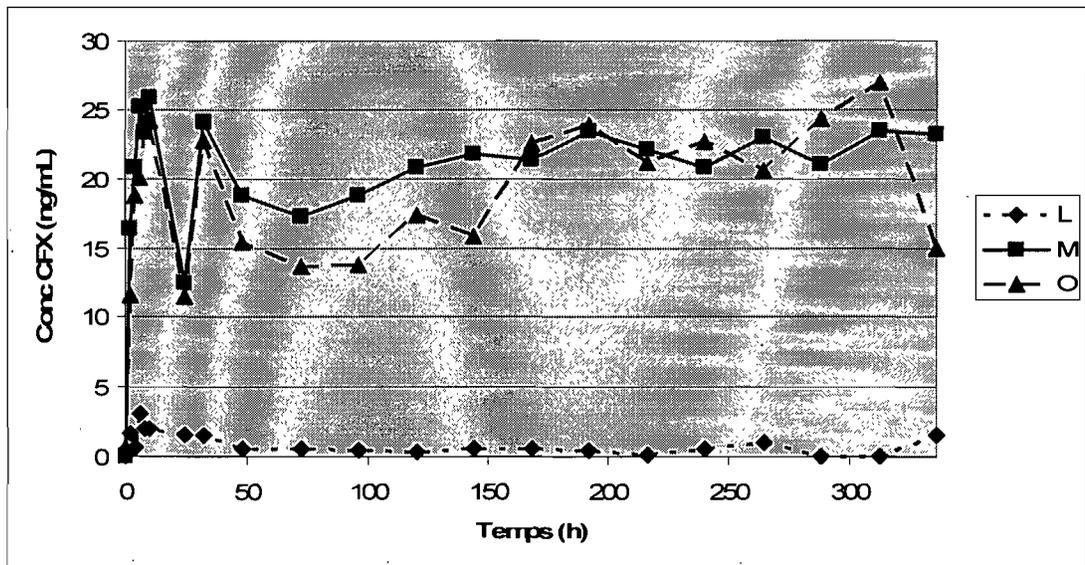


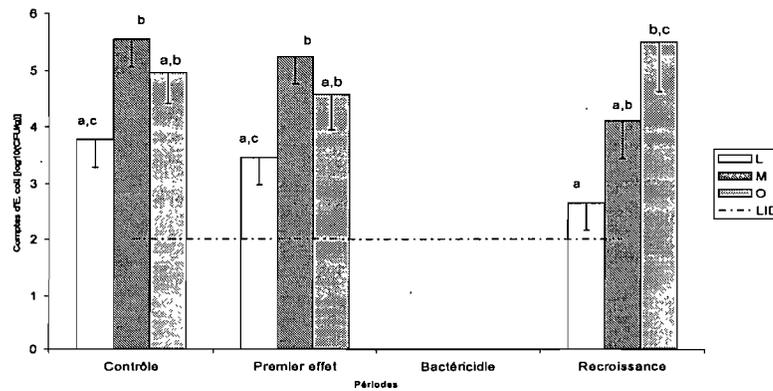
Tableau IV : Paramètres pharmacocinétiques de l'enrofloxacin et de la ciprofloxacine des groupes O, M et L.

Paramètres (Unité)	ENROFLOXACINE			CIPROFLOXACINE		
	O	M	L	O	M	L
AUC _{0-24h} (h•µg/mL)	8482 ±3816	6344 ±3625	-	411.9 ±209	455.4 ±162.6	-
AUC _{0-336h} (h•µg/mL)	158686 ±90862	90079 ±51277	2100 ±229	-	-	560 ±473
λ _z ^a (/h)	0.061 ±0.025	0.058 ±0.019	0.005 ±0.003	-	-	-
C _{max} (µg/L)	838 ±208	499.7 ±348.6	26.4 ±2.5	26.6 ±12.7	27.5 ±6.6	5.1 ±3.5
t _{max} ^a (h)	3.6 ±2.6	3.3 ±2.1	3.4 ±1.9	7.6 ±2.6	8.3 ±2.0	13.3 ±11.9
MRT (h)	19.70 ±7.79	19.38 ±5.96	301.28 ±100.79	-	-	-
T _{1/2} -λ _z ^b (h)	11.4	11.97	150.1	-	-	-
CL/F (L/h/kg)	0.0005 ±0.0001	0.0007 ±0.0003	0.0017 ±0.0003	-	-	-
V/F (L/kg)	0.010 ±0.007	0.015 ±0.012	0.359 ±0.045	-	-	-

3. Comptages bactériens d'*E. coli* fécaux

Durant la période contrôle, la population bactérienne d'*E. coli* dans le groupe O était de $10^{4.96} \pm 10^{0.56}$ CFU/g, non significativement différente de celle des groupes M et L ($p=0.43$ et 0.12). L'administration d'EFX par voie orale a entraîné, de manière identique aux deux autres voies, une diminution marquée de la population d'*E. coli* fécaux durant les deux jours suivant la première dose (période de premier effet) jusqu'à des valeurs inférieures au seuil de détection (100 CFU/g). La durée de la période de premier effet dans le groupe O était de 1.75 ± 0.25 jours, comparativement à 2.43 ± 0.48 jours et 1.71 ± 0.18 jours pour le groupe M et L respectivement (analyse de survie : $p=0.3$ et 0.9). La durée de la période de bactéricidie était de 9.5 ± 2.18 jours, significativement supérieure à celle du groupe L (4.57 ± 0.72 jours, analyse de survie : $p=0.031$) mais non significativement différente de celle du groupe M (8 ± 1.66 jours, analyse de survie : $p=0.77$). Durant la période de recroissance bactérienne, cette population n'était pas significativement différente de la valeur contrôle ($10^{5.5} \pm 10^{0.88}$ CFU/g, $p=0.61$).

Figure 11 : Comptages bactériens d'*E. coli* fécaux obtenus dans les groupes L, M et O.



LID : limite inférieure de détection bactérienne. a,b,c : différence significative entre lettres différentes.

Il est à noter qu'un des porcs du groupe O n'a présenté aucune variation significative des comptages d'*E. coli* durant toute la durée de l'étude. Ce porc présentait selon toute vraisemblance une population bactérienne déjà résistante à l'EFX préalablement à notre projet. En l'excluant, le nombre de porcs par groupe pour lesquels les comptes bactériens sont restés sous la limite inférieure de détection durant toute la durée d'administration d'EFX était de 0/7 (0%) dans le groupe L, 3/7 (43%) dans le groupe M et 3/4 (75%) dans le groupe O (différence significative entre les groupes L et M, $p=0.03$).

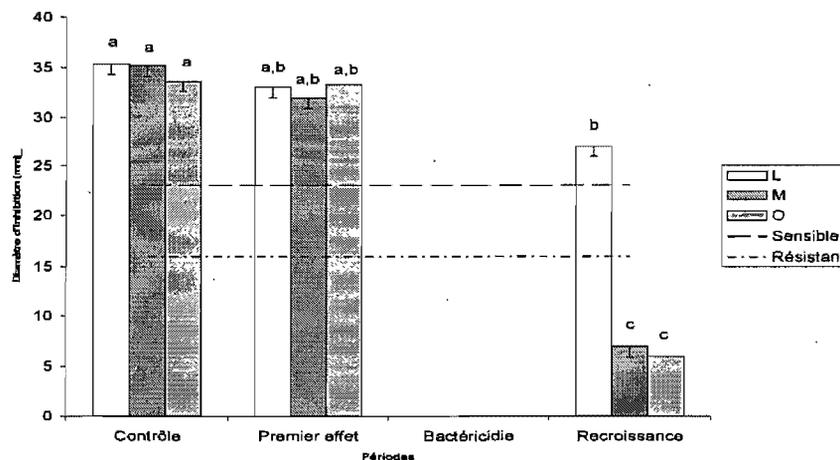
4. Sensibilité et résistance des bactéries *E. coli*

Concernant l'EFX, un effet temps, un effet groupe et une interaction groupe X temps significatifs ont été mis en évidence dans le groupe O ($p<0.001$). Dans le groupe O, les diamètres d'inhibition n'était pas significativement différent entre la période contrôle et celle de premier effet ($p=0.73$) mais l'étaient entre la période contrôle et celle de recroissance ($p<0.0001$). Durant la période de recroissance, la population d'*E. coli* présente était résistante à l'EFX et les diamètres d'inhibition n'était pas significativement différent entre les groupes O et M ($p=0.98$), mais étaient significativement inférieurs à celui du groupe L ($p<0.0001$) (**Figure 12**).

Concernant les deux autres FQ, un effet temps, un effet groupe et une interaction groupe X temps significatifs ont été mis en évidence dans le groupe O ($p<0.001$ pour les deux antibiotiques). Les résultats de sensibilité des *E. coli* fécaux vis-à-vis de la CFX et de l'acide nalidixique étaient similaires à ceux observés pour l'EFX. Une excellente corrélation a été mise

en évidence entre l'EFX et la CFX (0.97), l'EFX et l'acide nalidixique (0.97) et la CFX et l'acide nalidixique (0.95).

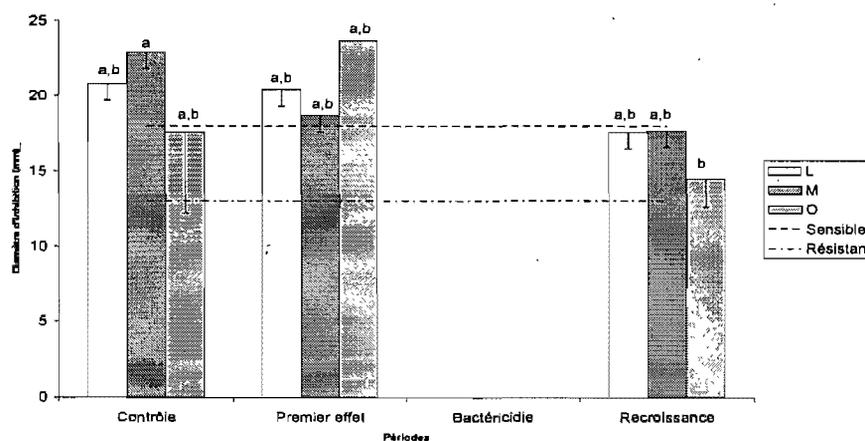
Figure 12 : Sensibilités à l'enrofloxacin obtenues dans les groupes L, M et O.



a,b,c : différence significative entre lettres différentes.

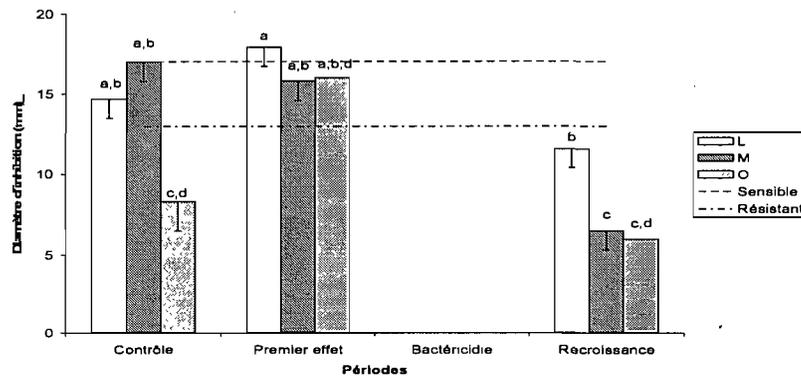
Concernant les autres antibiotiques, aucune variation significative des diamètres d'inhibition n'a été observée entre la période contrôle et les périodes de premier effet et de recroissance (respectivement, $p=0.32$ et $p=0.24$) pour l'amoxicilline et pour l'ampicilline (respectivement, $p=0.13$ et $p=0.08$) dans le groupe O (Figures 13 et 14). Les coefficients de corrélation, dans les trois groupes confondus, étaient de 0.32 entre l'EFX et l'amoxicilline et de 0.53 entre l'EFX et l'ampicilline.

Figure 13 : Sensibilités à l'amoxicilline obtenues dans les groupes L, M et O.



a,b : différence significative entre lettres différentes.

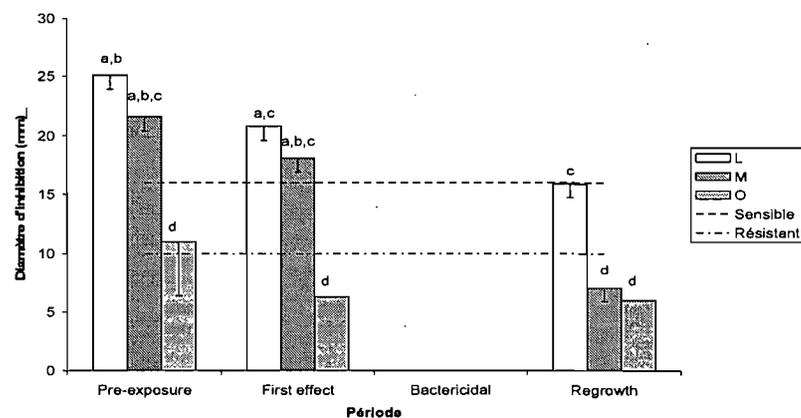
Figure 14 : Sensibilités à l'ampicilline obtenues dans les groupes L, M et O.



a,b,c,d : différence significative entre lettres différentes.

Un effet temps, un effet groupe et une interaction groupe X temps significatifs ont été mis en évidence pour le TMS ($p < 0.001$). Dans le groupe O, aucune variation significative des diamètres d'inhibition n'a été observée entre la période contrôle et les périodes de premier effet et de recroissance (respectivement, $p = 0.48$ et $p = 0.29$) pour le TMS. La corrélation entre l'EFX et le TMS, tous groupes confondus, était de 0.67.

Figure 15 : Sensibilités au sulfamide/triméthoprième obtenues dans les groupes L, M et O.



a,b,c, d : différence significative entre lettres différentes.

Aucune variation significative vis-à-vis du ceftiofur, de la gentamicine, de la streptomycine, de la tétracycline, de l'apramycine et du florfenicol n'a été mise en évidence dans chacun des trois groupes. Une excellente corrélation a été mise en évidence, dans les trois groupes confondus, entre l'amoxicilline et le ceftiofur (0.88) et entre l'amoxicilline et l'ampicilline (0.82).

Chapitre cinquième

DISCUSSION ET CONCLUSION

1. Discussion

1.1. Validité de nos voies d'administrations et de nos marqueurs

1.1.1. Variations des concentrations plasmatiques en enrofloxacin et en ciprofloxacin

Nos implants EFX-PMMA ont été fabriqués afin de répondre à deux critères : (1) entraîner des concentrations systémiques en EFX faibles durant une période de temps prolongée et (2) mimer la situation clinique où, la plupart du temps, les cliniciens fabriquent leur propres implants et choisissent la nature de l'antibiotique en fonction de la sensibilité des bactéries en jeu et la quantité d'implants placés en fonction de la place disponible. L'EFX et le PMMA sont des choix cliniquement justifiables dans ce but : l'EFX est une FQ efficace contre les staphylocoques et les bactéries Gram-négatives qui sont les agents principalement impliqués lors d'OMPT, et le PMMA est toujours considéré comme le standard de matrice d'implant tant qu'un matériau résorbable et abordable financièrement n'est pas disponible commercialement [15, 58, 60, 135]. En outre, des concentrations plasmatiques en EFX très faibles ont été obtenues durant toute la durée de notre étude grâce à ces implants, tel que décrit dans la littérature concernant la plupart des SLLM [58, 135].

Il est cependant bien établi que le matériau utilisé comme matrice (sa forme, son degré de porosité, son volume, etc.) ainsi que la nature et la concentration de l'antibiotique incorporé influence grandement les caractéristiques d'éluion d'un SLLM [4, 6, 31, 40, 51, 104]. Les concentrations plasmatiques en EFX mesurées après implantation présentaient un aspect typiquement biphasique avec une libération rapide durant les 24 premières heures, résultant vraisemblablement de la dilution de la fraction d'antibiotique faiblement adhéree à la surface des implants. Par la suite, l'éluion d'EFX présente dans les couches plus profondes ont entraîné les faibles concentrations subséquentes maintenues durant une période prolongée. Des études d'éluion *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'une évaluation microscopique de nos implants (porosité, etc.) aurait pu être réalisées afin de caractériser plus précisément leurs propriétés. Cependant, il nous est apparu que cela sortait du cadre de notre projet, nos implants remplissant les critères pré-établis que nous nous étions fixés.

Les ratios des AUC de CFX sur EFX (environ 5 % pour la voie orale et 8 % pour la voie IM et locale) observés dans notre étude sont beaucoup plus bas que ceux rapportés chez le chien et le bovin (environ 50 %) et se rapprochent plus de ceux rapportés chez le chat (20 %) [77]. Cela suggère que l'efficacité du porc à métaboliser l'EFX en CFX (métabolisme de phase I, effectué via CYP 1A probablement) est moindre, ou bien que le porc peut conjuguer rapidement l'EFX avant même qu'il puisse être converti en CFX. D'autres études rapportent l'absence de concentration plasmatique ou urinaire de CFX mesurable après l'administration d'EFX par voie orale, IM ou IV chez le porc [76, 89, 90] et penchent pour la 1^{ère} hypothèse. La différence de ratios d'AUC entre les 2 voies générales peut être expliquée par un effet de 1^{er} passage hépatique (par voie orale, 100% de la dose biodisponible transite par le foie, alors que par voie injectable il y a uniquement 25% qui y transite).

1.1.2. *Escherichia coli* comme indicateur bactériologique et contrôle des variables

Escherichia coli est une bactérie à Gram négatif et est un des constituants principaux de la flore fécale commensale des mammifères. Il est considéré comme un « indicateur/marqueur » très fiable de la flore fécale et est à ce titre très souvent utilisé dans les études sur l'antibiorésistance [113]. Cependant, de nombreux facteurs autres que l'administration d'antibiotique peuvent influencer le développement et l'élimination dans l'environnement de bactéries résistantes. Ces facteurs sont [113] :

- Le stress lié au transport, à la surpopulation dans les enclos ou aux manipulations : une période d'acclimatation de quatre jours était strictement respectée pour tous les porcs avant le début du projet. Les manipulations liées aux chirurgies et aux prélèvements quotidiens étaient gardées au minimum et étaient homogènes entre les trois groupes. Les manipulations liées aux traitements étaient quant à elles par définition différentes selon les groupes de traitement (injection IM pour le groupe M versus administration via la sonde oesophagienne pour le groupe O versus aucune manipulation pour le groupe L) mais il est peu probable que cela ait eu un impact significatif sur nos résultats étant donné le peu de temps et de stress reliés à ces manipulations.

- Les conditions climatiques de logement : la température, le taux d'humidité et la durée d'éclairage des différents cubicules étaient strictement contrôlés et gardés égaux entre les groupes de traitement et constants au cours du projet.
- L'origine des bactéries fécales analysées : il a été démontré que les segments intestinaux proximaux (iléon et caecum) présentaient un taux de bactéries résistantes supérieur à celui des segments digestifs distaux (colon et rectum) [113]. Les échantillons que nous avons prélevés ont toujours été constitués des selles fraîches ou rectales. Il avait été envisagé de réaliser des prélèvements de contenu iléocæcal via une canule installée chirurgicalement au niveau de la valvule iléocæcale. Ceci n'a pu être réalisé pour des raisons matérielles.
- L'âge des porcs : il a été démontré que les porcs de moins de sept mois présentaient des taux de bactéries fécales résistantes supérieurs à ceux de porcs plus âgés [113]. Les porcs utilisés dans notre étude étaient tous âgés de 4 à 8 semaines.

Le fait de connaître et de maîtriser ces facteurs nous a permis de les standardiser entre les différents groupes de traitement et ainsi de minimiser une éventuelle interférence avec l'évaluation d'*E. coli* comme indicateur bactériologique.

1.2. Effet de l'implantation de notre système à libération locale maîtrisée sur la flore fécale

Durant les dernières années, les SLLM ont acquis une importante popularité dans le traitement et la prévention des OMPT et des infections de prothèses articulaires aussi bien chez l'homme que chez les animaux. Cependant, suite à cet engouement, de plus en plus de questions ont été soulevées, notamment concernant leur potentiel de sélection de bactéries pathogènes résistantes [61, 108, 122, 131, 136], un problème qui est favorisé par l'apparition d'un biofilm à la surface des implants orthopédiques très peu de temps après leur mise en place [7, 8, 85, 93]. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à un aspect qui, à notre connaissance, n'a encore jamais été évalué : l'effet de concentrations antibiotiques systémiques très faibles de manière prolongée suite à l'implantation de SLLM sur la sélection de souches résistantes au niveau de la flore commensale fécale, et plus particulièrement *E. coli*.

Suite à l'implantation de notre SLLM, nous avons observé un premier effet antibiotique sur la population totale d'*E. coli*, avec une diminution temporaire mais significative des comptes bactériens dès le 2^e jour post-chirurgie. Ceci pourrait s'expliquer par le pic sérique d'EFX suite au relargage initial massif depuis nos implants, phénomène typique des SLLM. Ce pic, atteint 3.4±1.9 heures après implantation, s'élève à 26.4±2.5 µg/L et avoisine donc la CMI d'*E. coli* (30-125 µg/L) [135]. La présence d'EFX au niveau plasmatique en concentration non négligeable, dont une partie est sécrétée au niveau intestinal via les glycoprotéines P [103, 106, 144], serait donc vraisemblablement à l'origine de cet effet « systémique » répercuté sur la flore fécale. Cependant, même si la durée de la période de premier effet antibiotique n'était pas significativement différente entre les trois groupes de traitement, celle de la période de bactéricidie était nettement moins longue que pour les groupes O et M.

Suite à la période de bactéricidie, une recolonisation précoce de l'écosystème intestinal par *E. coli* a été observée (période de recroissance). D'après les tests de sensibilité aux antibiotiques réalisés sur des échantillons prélevés durant cette période, il apparaît que cette nouvelle population présentait une sensibilité moindre vis-à-vis de l'EFX par rapport aux souches d'*E. coli* de la période contrôle. Bien que cette baisse de sensibilité soit significative, il est néanmoins important de souligner que ces bactéries sont restées sensibles aux FQ, les valeurs de diamètre d'inhibition mesurées restant nettement supérieures à la valeur seuil sensible-intermédiaire (respectivement, 27.1±1.1 mm et 23 mm pour l'EFX). Cette variation de la sensibilité de la population d'*E. coli* est vraisemblablement elle aussi liée au pic systémique initial d'EFX précédemment mentionné. Cependant, la pression de sélection exercée par ces concentrations intestinales en EFX ne semble pas avoir été d'intensité et de durée suffisante pour résulter en des modifications de sensibilité bactérienne aussi dramatiques et durables qu'avec les administrations orale et IM. Ceci signifierait que les concentrations intestinales obtenues suite à l'implantation de notre SLLM se sont situées proches, et vraisemblablement en dessous de la limite inférieure de la FSM (i.e. la CMI) la plus grande partie de notre étude.

Nous avons donc pu confirmer notre première hypothèse : bien qu'une diminution légère de sensibilité aux FQ ait été observée suite à l'implantation de notre SLLM, ces changements étaient mineurs et dramatiquement moins importants qu'avec une administration orale ou IM. Étant donné cet impact faible mais significatif des SLLM sur la sensibilité bactérienne, leur usage en prophylaxie doit être réfléchi et bien justifié, notamment après avoir évalué les risques réels d'infection et leurs conséquences. Pour le traitement d'infections osseuses, en plus d'une

efficacité similaire voire supérieure aux voies d'administration orale ou IM, les SLLM semblent donc aussi avantageux par rapport à une administration systémique d'un point de vue de la sélection de souches commensales résistantes [58, 116].

1.3. Effet de l'administration systémique d'enrofloxacin sur la flore fécale

Suite à l'administration d'EFX par voie systémique, orale ou IM, nous avons observé un premier effet antibiotique sur la population totale d'*E. coli*, avec une diminution rapide et significative des comptes bactériens dès le 2^e jour d'administration, jusqu'à l'atteinte de concentrations non détectables (période de bactéricidie). Ce résultat était évidemment attendu étant donné l'efficacité reconnue des FQ contre les bactéries à Gram négatif et les concentrations systémiques obtenues bien au-dessus de la CMI d'*E. coli* (30-125 µg/L) [135]. Cet impact sur la flore fécale signifie donc que des concentrations « thérapeutiques » ont été atteintes au niveau de la lumière intestinale après traitement oral ou IM. La présence d'EFX au niveau intestinal peut être due à la voie d'administration pour le groupe O et au métabolisme de l'EFX avec une élimination intestinale via les glycoprotéines P pour les groupes O, M et L [103, 106, 144]. La durée de la période de premier effet antibiotique n'était pas significativement différente entre les deux groupes de traitement, illustrant une rapidité d'action cliniquement similaire entre les deux modalités d'administration. De même, la durée de la période de bactéricidie dans le groupe O (9.5±2.18 jours) n'était pas significativement différente de celle du groupe M (8±1.66 jours).

Suite à cette période de bactéricidie, une recolonisation tardive de l'écosystème intestinal par *E. coli* a été observée (période de recroissance). Néanmoins, les valeurs de sensibilité à l'EFX ont mis en évidence que cette nouvelle population présentait une résistance majeure à cet antibiotique par rapport aux souches d'*E. coli* de la période de contrôle. Ces résultats corroborent ceux de Wiuff et coll. [139]. Ainsi, les souches résistantes présentes durant la période de recroissance ont vraisemblablement été sélectionnées à partir de quelques souches mutantes préexistantes, initialement présentes en très faible nombre [139]. Pour que des mutants résistants se développent dans un écosystème, un événement exerçant une pression de sélection doit intervenir, comme l'exposition à l'antibiotique incriminé à des concentrations sub-bactéricides. Il a été démontré que l'administration d'un antibiotique entraînant des concentrations à

l'intérieur de la FSM favorisait la prolifération sélective des souches résistantes, alors que des concentrations supérieures à la CPM évitaient cette sélection [34, 148]. Cette théorie, appliquée à nos résultats, mettrait en évidence le fait que l'administration de 5 mg/kg/jour d'EFX, par voie orale ou IM, a entraîné des concentrations intestinales en EFX globalement à l'intérieur de la FSM. La bactéricidie observée sur la majorité des individus implique des concentrations au-dessus de la CMI, mais l'émergence et le développement de souches résistantes implique des concentrations sous la CPM. Cependant, en faisant une analyse individuelle, on observe qu'un certain nombre de porcs (3/7 dans le groupe M et 3/4 dans le groupe O) n'ont présenté aucune recroissance bactérienne durant toute la durée du projet : ceci nous permettrait alors de supposer que l'administration d'EFX a entraîné des concentrations intestinales en EFX très proches de la limite supérieure de la FSM, c'est à dire près de la CPM. Ceci expliquerait que pour certains porcs (ceux sans recroissance bactérienne), la CPM ait été dépassée alors que pour d'autres (ceux avec recroissance bactérienne), les taux intestinaux soient restés sous le seuil de CPM.

Bien que statistiquement non significatif, on observe également que la proportion de porcs sans recroissance bactérienne est supérieure dans le groupe O par rapport au groupe M. Cette tendance pourrait s'expliquer de deux manières :

- des concentrations intestinales en EFX différentes : ceci pourrait être dû à la présence des glycoprotéines P qui limite l'absorption intestinale d'EFX administrée par voie orale et augmenterait donc la fraction restant dans la lumière intestinale [103, 106, 144]. Ceci aurait alors deux conséquences. D'une part, des concentrations intestinales en EFX accrues lors d'administration orale permettraient potentiellement de se rapprocher voire de dépasser la CPM et limiterait/empêcherait ainsi la sélection de souches mutantes résistantes. D'autre part, ces concentrations intestinales accrues en EFX entraîneraient une éradication quantitativement plus importante de la population totale d'*E. coli* diminuant ainsi les risques de mutation ultérieure à l'origine de résistances. Cette hypothèse concorderait avec l'observation de Wiuff et coll. que le passage à une population totalement résistante à l'EFX était significativement plus rapide avec la voie IM (deux jours) qu'avec la voie orale (trois jours) [139].
- les différentes caractéristiques génotypiques à l'origine de la résistance aux FQ présents chez les souches de chaque porc et donc la différence entre leur CPM respectives [68, 92, 95].

Pour étudier ces observations, il aurait été nécessaire (1) de déterminer la nature précise des mutations à l'origine des résistances observées par analyse PCR, (2) de déterminer leur CPM respective et (3) de comparer cette valeur avec les concentrations fécales en EFX obtenues suite

à notre administration IM et orale, tel que cela a récemment été fait chez le poulet [68].

Tous les porcs utilisés ont été euthanasiés à la fin de notre projet. Il aurait été intéressant de poursuivre le suivi bactériologique plus longtemps et notamment après arrêt de l'administration d'EFX afin de voir si l'absence de pression de sélection entraînait le retour d'une population bactérienne sensible, et en combien de temps. Ceci a cependant déjà été rapporté par Wiuff et coll. : après trois jours consécutifs d'administration d'EFX par voie orale ou IM, le phénotype résistant de la population d'*E. coli* étudié persistait pendant au moins deux semaines [139].

Nos résultats ne nous permettent donc pas de confirmer notre seconde hypothèse, qui était que l'administration IM d'EFX est caractérisée par un taux de sélection de bactéries commensales résistantes supérieur à ceux de la voie orale. Ces résultats sont cependant à nuancer étant donné le faible nombre de porcs dans le groupe (5) et le fait que trois d'entre eux n'aient eu aucune recroissance bactérienne (ne laissant que deux individus pour analyse).

1.4. Développement de résistances croisées

Il a été décrit que les souches bactériennes présentant une résistance à une FQ étaient également résistantes aux autres FQ [135], comme cela a été observé dans notre étude avec la CFX et l'acide nalidixique. Cela s'explique par le fait que les mécanismes permettant de diminuer la sensibilité d'une bactérie à une FQ en particulier sont également efficaces contre les autres FQ étant donné leurs importantes similarités structurelle et fonctionnelle.

Cependant, nous avons également observé durant la période de recroissance des variations significatives de la sensibilité des souches d'*E. coli* vis-à-vis d'autres classes d'antibiotiques. Il est rapporté dans la littérature que les mutations conférant une résistance aux FQ via l'activation de pompes à efflux ou la modification de la perméabilité membranaire peuvent également entraîner une résistance à d'autres antibiotiques, notamment les céphalosporines et les tétracyclines [135]. À notre connaissance, ceci est le premier rapport rapportant une possible résistance croisée vis-à-vis de l'ampicilline et du TMS suite à l'administration d'EFX. Ces résistances croisées pourraient être dues à des mécanismes peu spécifiques de résistance aux FQ, c'est-à-dire le régulon marRAB responsable du nombre de porines au niveau de la membrane externe, et le système de pompe à efflux AcrAB-TolC au niveau de la membrane cytoplasmique [54].

Nous avons été surpris par les différences de sensibilité bactérienne entre l'amoxicilline et l'ampicilline pendant la période 4 étant donné que ces deux antibiotiques appartiennent à la même classe et sont souvent utilisés de manière interchangeable. Bien que ce résultat puisse être artéfactuel, il pourrait cependant également être expliqué par des affinités différentes des porines et pompes à efflux membranaires vis-à-vis de ces deux antibiotiques. Une autre hypothèse serait que, chez les mutants résistants aux FQ, des modifications des protéines liant les pénicillines (PBP) entraînant une affinité et/ou une perméabilité moindre aux pénicillines, soient intervenues [99]. Étant donné les affinités différentes pour les PBP entre l'ampicilline (PBP 2 et 3) et l'amoxicilline (PBP 1A et 2), les modifications de certaines PBP spécifiquement pourrait théoriquement affecter la sensibilité bactérienne d'une seule de ces deux pénicillines [133]. Évidemment, ces hypothèses nécessitent d'être validées par des analyses génétiques.

1.5. Avantages et inconvénients des systèmes à libération locale maîtrisée

Par rapport à l'administration d'antibiotiques par voie systémique (oral ou IM), l'administration par implant a apporté une meilleure tolérance au traitement. En effet, lors de l'administration d'EFX par voie orale via la sonde d'oesophagostomie, les porcs ont fréquemment présenté de l'hypersalivation, et des signes de nausée, vraisemblablement liées aux caractéristiques organoleptiques du produit [11]. De plus, pour l'administration orale ou les injections IM quotidiennes, une manipulation des porcs était nécessaire, ce qui était évité avec l'utilisation des implants. Bien que non problématique dans notre étude étant donné le respect strict des administrations IM et PO, l'observance du traitement est idéale avec l'usage des SLLM. En effet, la totalité de la dose est administrée en un seul épisode et ne requiert pas d'administrations répétées pouvant s'avérer fastidieuses. Ceci élimine ainsi les risques « d'oubli » de traitement ou de traitement incomplet (suite au vomissement du comprimé, etc.), facteurs de risque de développement de résistances [96].

Dans l'optique du traitement d'OMPT dans des conditions cliniques, il est bien décrit que la toxicité et les effets secondaires possibles sont minimisés avec l'utilisation de SLLM en diminuant les concentrations sériques en antibiotiques [43, 60, 73, 112, 116]. En effet, la libération maîtrisée d'antibiotiques permet d'éviter les pics et creux de concentrations sériques et surtout locales associées à une administration systémique ponctuelle [28, 51, 60, 81, 116]. Bien

qu'aucun effet secondaire systémique lié aux administrations orale et IM n'ait été observé dans notre étude, ceci est vraisemblablement lié à l'importante marge de sécurité des FQ, la faible durée du traitement (2 semaines) et l'absence d'analyses sanguines, biochimiques ou histologiques (notamment au niveau du cartilage) pour confirmer ces observations.

De plus, la quantité d'antibiotique nécessaire au traitement peut être réduite avec l'utilisation d'un SLLM. Dans notre projet, une dose totale de 45 mg/kg a été administrée aux porcs du groupe L en comparaison d'une dose de 70 mg/kg pour les groupes O et M. Ainsi, dépendamment du coût du matériau matrice utilisé (ici, le PMMA), les coûts de traitement peuvent être minimisés avec l'utilisation de SLLM par rapport à une administration systémique et avec une efficacité au moins équivalente [13, 28].

La mise en place des SLLM demande une anesthésie générale avec approche chirurgicale. Cependant, leur indication principale étant le traitement des OMPT, une intervention chirurgicale est de toute façon requise pour permettre un débridement du site, un éventuel remplacement des implants orthopédiques, et la mise en place d'une greffe d'os spongieux ou autre substitut. Un désavantage peut certainement être lié au caractère non résorbable de certaines matrices, tel que le PMMA utilisé dans notre étude. L'utilisation de matrices non-résorbables demande ensuite une seconde intervention chirurgicale afin de retirer les implants. Bien que ceci n'ait pas été nécessaire dans notre étude étant donné sa nature terminale, cette étape doit être planifiée dans la gestion des patients qui ont été implantés avec un SLLM non résorbable. Cette contrainte peut cependant être éliminée par l'usage de matrices résorbables, telles que l'hydroxyapatite, malheureusement plus coûteuse et difficile à trouver commercialement. Même si la majorité de ces SLLM sont minimalement réactifs, certains peuvent causer de légères réactions inflammatoires et affecter des composantes de la réponse immunitaire [116, 137]. Cependant, ces effets sont des observations expérimentales et n'ont jamais été rapporté comme présentant des conséquences cliniques.

1.6. Limites de notre étude

La première limite de notre étude est liée au faible nombre d'individus, notamment dans le groupe O (n=5). L'absence de recroissance bactérienne chez certains porcs après la période de bactéricidie nous a également privé des données de ces individus pour l'analyse des sensibilités bactériennes aux antibiotiques (n=7, 4 et 2 dans les groupe L, M et O respectivement). Il est

possible que l'absence de différences significatives, notamment dans/entre les deux groupes avec administration systémique soit due à des erreurs statistiques de type 2.

Les concentrations auxquelles les *E. coli* ont été exposées avec les implants étaient environ 10 fois moindres que les bactéries des porcs traités par injection. Le rapport des AUC(J0→J21) de ces 2 traitements, divisé par leurs doses totales respectives (c.à.d., 2100/45.5, divisé par 158686/105 = 3%) confirme cette différence d'exposition (**Figures 9 et 10 et Tableau IV**). Ceci a donc été à l'origine d'une différence d'exposition de la flore fécale à l'EFX et à la CFX mais, étant donné qu'aucune administration intraveineuse n'a été réalisée, il nous est impossible à ce stade de déterminer leur absorption et leur métabolisme, et leur contribution respective à la sélection de souches fécales résistantes. Cependant, étant donné la nature de notre questionnement initial (sur le développement potentiel de résistances lors de l'utilisation clinique de SLLM en comparaison avec autres voies d'administration), nous pensons qu'un modèle basé sur l'usage des doses cliniques classiques, avec des doses totales d'EFX différentes selon les voies d'administration (ce qui est inhérent au mode d'action particulier des SLLM) était plus représentatif et intéressant qu'un modèle pharmacologique dans lequel toutes les expositions antibiotiques auraient été égales.

Dans notre étude, la mise en place de notre SLLM était réalisée en périphérie d'un fémur sain et ne représentait donc pas les conditions locales rencontrées lors d'OMPT. Cependant, la présence d'une inflammation sévère des tissus environnants, classiquement retrouvée lors d'OMPT, pourrait potentiellement modifier l'absorption systémique de l'antibiotique libéré. Les études d'éluion *in vivo* jusqu'à présent ont été réalisées soit sur des modèles d'OMPT [25, 58, 73, 88], soit sur des os sains [4, 102, 134]. À notre connaissance, aucune étude n'a comparé directement l'absorption systémique d'un antibiotique suite à l'implantation d'un SLLM au niveau d'un os sain ou atteint d'OMPT. Il est donc difficile de conclure sur l'influence éventuelle que le choix de notre modèle a eu sur nos résultats.

Nous n'avons pas jugé nécessaire d'inclure un groupe témoin négatif (sans administration d'EFX) dans chacune des répétitions durant toute la durée de notre projet. En effet, les conditions environnementales étant très contrôlées (température, humidité, durée d'éclairage, procédure de désinfection), il nous a semblé plus approprié d'utiliser chaque individu comme autocontrôle. Les comptes bactériens durant la période contrôle étant significativement différents entre les groupe L et O/M, la probabilité d'avoir initialement des mutants antibiorésistants était

plus grande dans les groupes O et M et ceci aurait pu biaiser nos résultats. La fréquence des mutations génétiques responsables d'antibiorésistance aux FQ sont de 10^{-6} à 10^{-10} , ce qui suggérerait que le risque de biais dans notre étude était faible [2]. Cependant, un des porcs du groupe O n'a démontré aucune variation significative des comptages d'*E. coli* durant toute l'étude et présentait donc vraisemblablement une sous-population bactérienne déjà résistante à l'EFX préalablement à notre projet. Cela n'a néanmoins pas pu être mis en évidence par les analyses de sensibilités bactériennes des isolats durant la période 1 chez ce porc, possiblement lié à un nombre insuffisant d'isolats testés. L'inclusion de ce porc n'a pas entraîné de variations significatives dans les analyses statistiques mais la possibilité de contacts directs entre ce porc et les autres porcs du groupe O soulève cependant la question d'une potentielle contamination par ces souches initialement résistantes.

Finalement, nous savons que les conclusions tirées de notre étude réalisées avec des implants EFX-PMMA sont difficilement transposables à d'autres SLLM. Tel que mentionné précédemment, chaque combinaison antibiotique-matrice présente des caractéristiques d'élution spécifiques pouvant également varier de manière importante selon l'hôte. De plus, la résistance aux FQ intervient classiquement en plusieurs étapes, ce qui est différent de la plupart des résistances aux autres antibiotiques acquises en une seule mutation [54, 98, 135, 136].

1.7. Voies futures

Tel que mentionné précédemment, il serait théoriquement nécessaire de réaliser des études similaires avec d'autres associations d'antibiotiques et de matrices, notamment celles disponibles commercialement. Ceci permettrait éventuellement de confirmer/infirmier et d'intégrer les observations faites dans notre étude à une banque de données plus large sur les SLLM et ainsi de décrire de manière plus définitive leurs avantages et inconvénients vis-à-vis d'un traitement systémique.

Nous nous sommes limités dans notre étude à une seule flore commensale, à savoir la flore fécale et plus particulièrement son constituant aérobique majoritaire *E. coli*. Il serait également très intéressant de réaliser des études similaires en évaluant d'autres flores commensales, comme la flore cutanée ou naso-pharyngée par exemple. Concernant la flore cutanée, cela permettrait également d'évaluer l'impact de l'excrétion sudorifique des FQ, mise en évidence chez l'homme [52], sur la sélection de souches résistantes.

2. Conclusion

Notre projet a permis d'illustrer l'impact majeur qu'a l'administration d'un antibiotique, ici une FQ, sur la flore fécale, notamment *E. coli*. En effet, suite à l'administration de 5 mg/kg/j d'EFX par voie orale ou IM, la flore sensible a rapidement disparu et a été remplacée par une population résistante. Cette résistance était majeure à l'encontre de l'antibiotique administré (EFX), mais également des antibiotiques de la même classe (CFX et acide nalidixique) et de certains de classe différente (ampicilline et TMS). Malgré l'absence de résultats significatifs, certaines de nos observations ajoutent du crédit à notre hypothèse initiale, soit que la modalité d'administration d'un antibiotique a une influence sur le potentiel de sélection de souches résistantes. En effet, dans notre étude, l'administration orale d'EFX a semblé présenter une sélection de souches résistantes de moindre importance que la voie IM, vraisemblablement en corrélation avec des concentrations intestinales en EFX au-dessus de la FSM. Cependant, des études sur un plus grand nombre de porcs seraient nécessaires afin de confirmer ces hypothèses.

Notre projet évaluait également pour la première fois le développement de résistances bactériennes au niveau de la flore commensale fécale, plus particulièrement *E. coli* micro-organisme indicateur et potentiel réservoir de gènes de résistances, suite à l'utilisation d'un SLLM. Nous avons démontré que la mise en place d'implants de PMMA imprégnés d'EFX présentait un potentiel minime de sélection de bactéries résistantes au niveau des bactéries *E. coli* étudiées chez un modèle porcin. Bien que l'implantation de notre SLLM ait entraîné une diminution temporaire des comptes bactériens en *E. coli*, les intestins étaient rapidement recolonisés avec une population présentant une diminution significative mais très mineure de leur patron de sensibilité. Comparativement aux variations observées lors d'administration orale ou IM, l'administration locale de FQ par SLLM présente un avantage indéniable d'un point de vue de l'antibiorésistance. Cependant, il apparaît que l'impact des SLLM n'est pas nul au niveau de la flore commensale et leur utilisation doit donc être réfléchiée et justifiée, notamment en prophylaxie où les utilisations excessives sont plus fréquemment rencontrées.

BIBLIOGRAPHIE

1. SAS Online doc® 9.1.3. Cary, U.S.A., SAS Institute Inc. 2004.
2. Acar JF, Goldstein FW. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. Clin Infect Dis. 1997;24 Suppl 1:S67-S73.
3. Adams HR. Fluoroquinolones. In: Veterinary Pharmacology and Therapeutics (ed. Adams H. R.). Iowa State Press: Ames, 1995; 832-841.
4. Adams K, Couch L, Cierny G et coll. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate beads. Clin Orthop Relat Res. 1992;278: 244-252.
5. Aimin C, Chunlin H, Juliang B et coll. Antibiotic loaded chitosan bar. An *in vitro*, *in vivo* study of a possible treatment for osteomyelitis. Clin Orthop Relat Res. 1999;366:239-247.
6. Anguita-Alonso P, Rouse MS, Piper KE et coll. Comparative study of antimicrobial release kinetics from polymethylmethacrylate. Clin Orthop Relat Res. 2006;445:239-244.
7. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Effects on antibiotic resistance of *Staphylococcus epidermidis* following adhesion to polymethylmethacrylate and to silicone surfaces. Biomaterials 2002;23:1495-1502.
8. Arizono T, Oga M, Sugioka Y. Increased resistance of bacteria after adherence to polymethyl methacrylate. An *in vitro* study. Acta Orthop Scand. 1992;63:661-664.
9. Ball P. Bacterial resistance to fluoroquinolones: lessons to be learned. Infection 1994;22 Suppl 2:S140-S147.
10. Bartoloni A, Bartalesi F, Mantella A et coll. High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy antimicrobial consumption. J Infect Dis. 2004;189:1291-1294.
11. Becker R. Untersuchungen über Faktoren, welche die Aufnahme von Futterungsernährungsmitteln im Ben. Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin. Thesis. 1993:0-186.

12. Belloc C, Lam DN, Pellerin JL et coll. Effect of quinolone treatment on selection and persistence of quinolone-resistant *Escherichia coli* in swine faecal flora. *J Appl Microbiol.* 2005;99:954-959.
13. Blaha JD, Calhoun JH, Nelson CL et coll. Comparison of the clinical efficacy and tolerance of gentamicin PMMA beads on surgical wire versus combined and systemic therapy for osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res.* 1993;295:8-12.
14. Braden TD. The sensitivity and specificity of radiology and histopathology in the diagnosis of post-traumatic osteomyelitis. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 1989;3:98-98.
15. Braden TD. Posttraumatic osteomyelitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1991;21:781-811.
16. Calhoun JH, Henry SL, Anger DM et coll. The treatment of infected nonunions with gentamicin-polymethylmethacrylate antibiotic beads. *Clin Orthop Relat Res.* 1993;295:23-27.
17. Calhoun JH, Mader JT. Treatment of osteomyelitis with a biodegradable antibiotic implant. *Clin Orthop Relat Res.* 1997;341:206-214.
18. Caywood DD, Wallace LJ, Braden TD. Osteomyelitis in the dog: a review of 67 cases. *J Am Vet Med Assoc.* 1978;172:943-946.
19. Cesaro A, Roth Dit BR, Lascols C et coll. Low selection of topoisomerase mutants from strains of *Escherichia coli* harbouring plasmid-borne qnr genes. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(5):1007-1015.
20. Chen NT, Hong HZ, Hooper DC et coll. The effect of systemic antibiotic and antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate beads on the bacterial clearance in wounds containing contaminated dead bone. *Plast.Reconstr.Surg.* 1993;92:1305-1311.
21. Ciampolini J, Harding KG. Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often? *Postgrad Med J.* 2000;76:479-483.
22. Cohn LA, Gary AT, Fales WH et coll. Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. *J Vet Diagn Invest.* 2003;15:338-343.

23. Collier CT, Smiricky-Tjardes MR, Albin DM et coll. Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. *J Anim Sci.* 2003;81:3035-3045.
24. Cooke CL, Singer RS, Jang SS et coll. Enrofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs with urinary tract infections. *J Am Vet Med Assoc.* 2002;220:190-192.
25. Cornell CN, Tyndall D, Waller S et coll. Treatment of experimental osteomyelitis with antibiotic-impregnated bone graft substitute. *J Orthop Res.* 1993;11:619-626.
26. Craig WA, Ebert SC. Killing and regrowth of bacteria *in vitro*: a review. *Scand J Infect Dis.* 1990;Suppl 74:63-70.
27. Cromwell GL. Why and how antibiotics are used in swine production. *Anim Biotechnol.* 2002;13:7-27.
28. Dash AK, Cudworth GC. Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1998;40:1-12.
29. Del Castillo JRE. Pharmacocinétique et pharmacodynamie des tétracyclines administrées via l'aliment chez le porc. Thèse de PhD, Université de Montréal, 2001, 199 p.
30. Delsol AA, Sunderland J, Woodward MJ et coll. Emergence of fluoroquinolone resistance in the native *Campylobacter coli* population of pigs exposed to enrofloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:872-874.
31. DiMaio FR, O'Halloran JJ, Quale JM. *In vitro* elution of ciprofloxacin from polymethylmethacrylate cement beads. *J Orthop Res.* 1994;12:79-82.
32. Docic M, Bilkei G. Differences in antibiotic resistance in *Escherichia coli*, isolated from East-European swine herds with or without prophylactic use of antibiotics. *J Vet Med B Infect.Dis.Vet Public Health* 2003; 50: 27-30.
33. Domagala JM. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother.* 1994;33:685-706.

34. Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:11-17.
35. El Bahri L, Blouin A. Fluoroquinolones : a new family of antimicrobials. *Comp Contin Educ Vet Pract.* 1991;13:1429-1433.
36. Ena J, Lopez-Perezagua MM, Martinez-Peinado C et coll. Emergence of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolates after widespread use of fluoroquinolones. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;30:103-107.
37. Endtz HP, Ruijs GJ, van Klingeren B et coll. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J Antimicrob Chemother.* 1991;27:199-208.
38. Escribano E, Calpena AC, Garrigues TM et coll. Structure-absorption relationships of a series of 6-fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:1996-2000.
39. Espehaug B, Engesaeter LB, Vollset SE et coll. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty. Review of 10,905 primary cemented total hip replacements reported to the Norwegian arthroplasty register, 1987 to 1995. *J Bone Joint Surg Br.* 1997;79:590-595.
40. Ethell MT, Bennett RA, Brown MP et coll. *In vitro* elution of gentamicin, amikacin, and ceftiofur from polymethylmethacrylate and hydroxyapatite cement. *Vet Surg.* 2000;29:375-82.
41. Ganiere JP, Medaille C, Limet A et coll. Antimicrobial activity of enrofloxacin against *Staphylococcus intermedius* strains isolated from canine pyodermas. *Vet Dermatol.* 2001;12:171-175.
42. Garau J, Xercavins M, Rodriguez-Carballeira M et coll. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2736-2741.
43. Garvin KL, Miyano JA, Robinson D et coll. Polylactide/polyglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. A canine model. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:1500-1506.

44. Gitelis S, Brebach GT. The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant. *J Orthop Surg.(Hong.Kong.)* 2002;10:53-60.
45. Goettsch W, van Pelt W, Nagelkerke N et coll. Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in the netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46:223-228.
46. Goldmann DA, Huskins WC. Control of nosocomial antimicrobial-resistant bacteria: a strategic priority for hospitals worldwide. *Clin Infect Dis.* 1997;24 Suppl 1:S139-S145.
47. Gursel I, Korkusuz F, Turesin F et coll. *In vivo* application of biodegradable controlled antibiotic release systems for the treatment of implant-related osteomyelitis. *Biomaterials.* 2001;22:73-80.
48. Hanssen AD. Prophylactic use of antibiotic bone cement: an emerging standard--in opposition. *J Arthroplasty.* 2004;19:73-77.
49. Hanssen AD. Local antibiotic delivery vehicles in the treatment of musculoskeletal infection. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;437:91-96.
50. Hanssen AD, Osmon DR, Patel R. Local antibiotic delivery systems: where are we and where are we going? *Clin Orthop Relat Res.* 2005;437:111-114.
51. Henry SL, Galloway KP. Local antibacterial therapy for the management of orthopaedic infections. Pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet.* 1995;29:36-45.
52. Hoiby N, Jarlov JO, Kemp M et coll. Excretion of ciprofloxacin in sweat and multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. *Lancet* 1997;349:167-169.
53. Holtom PD, Pavkovic SA, Bravos PD et coll. Inhibitory effects of the quinolone antibiotics trovafloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin on osteoblastic cells *in vitro*. *J Orthop Res.* 2000;18:721-727.
54. Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat.* 1999;2:38-55.
55. Hooper DC. Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs.* 1999;58 Suppl 2:6-10.

56. Hooper DC. Fluoroquinolone resistance: epidemiology and mechanism. *ISAAR*. 2005;52-54.
57. Humphrey TJ, Jorgensen F, Frost JA, et coll. Prevalence and subtypes of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter spp.* in commercial poultry flocks before, during, and after treatment with fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49:690-698.
58. Huneault LM, Lussier B, Dubreuil P et coll. Prevention and treatment of experimental osteomyelitis in dogs with ciprofloxacin-loaded crosslinked high amylose starch implants. *J Orthop Res.* 2004;22:1351-1357.
59. Johnson KA. Osteomyelitis in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc.* 1994;204:1882-1887.
60. Kanellakopoulou K, Giamarellos-Bourboulis EJ. Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs.* 2000;59:1223-1232.
61. Kendall RW, Duncan CP, Smith JA et coll. Persistence of bacteria on antibiotic loaded acrylic depots. A reason for caution. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;329:273-280.
62. Kristinsson KG. Mathematical models as tools for evaluating the effectiveness of interventions: a comment on Levin. *Clin Infect Dis.* 2001;33 Suppl 3:S174-S179.
63. Kronvall G, Larsson M, Boren C et coll. Extended antimicrobial resistance screening of the dominant faecal *Escherichia coli* and of rare resistant clones. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;26:473-478..
64. Levin BR. Minimizing potential resistance: a population dynamics view. *Clin Infect Dis.* 2001;33 Suppl 3:S161-S169.
65. Levin BR, Lipsitch M, Perrot V et coll. The population genetics of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis.* 1997;24 Suppl 1:S9-16.
66. Lew DP, Waldvogel FA. Use of quinolones in osteomyelitis and infected orthopaedic prosthesis. *Drugs.* 1999;58 Suppl 2:85-91.
67. Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc.).* 2005;70:267-274.

68. Li Q, Bi X, Diao Y et coll. Mutant-prevention concentrations of enrofloxacin for *Escherichia coli* isolates from chickens. *Am J Vet Res.* 2007;68:812-815.
69. Lidin-Janson G, Kaijser B, Lincoln K et coll. The homogeneity of the faecal coliform flora of normal school-girls, characterized by serological and biochemical properties. *Med Microbiol Immunol.* 1978;164:247-253.
70. Mader JT, Calhoun J, Cobos J. *In vitro* evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:415-418.
71. Mader JT, Shirtliff M, Calhoun JH. Staging and staging application in osteomyelitis. *Clin Infect Dis.* 1997;25:1303-1309.
72. Mader JT, Shirtliff ME, Bergquist SC et coll. Antimicrobial treatment of chronic osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;360:47-65.
73. Mader JT, Stevens C M, Stevens JH et coll. Treatment of experimental osteomyelitis with a fibrin sealant antibiotic implant. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;403:58-72.
74. Malchau H, Herberts P, Ahnfelt L. Prognosis of total hip replacement in Sweden. Follow-up of 92,675 operations performed 1978-1990. *Acta Orthop Scand.* 1993;64:497-506.
75. Malorny B, Schroeter A, Helmuth R. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2278-2282.
76. Manceau J, Gicquel M, Laurentie M et coll. Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in animal biological fluids by high-performance liquid chromatography. Application in pharmacokinetic studies in pig and rabbit. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999;726:175-184.
77. Martinez M, McDermott P, Walker R. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Vet J.* 2006;172:10-28.

78. Mateu E, Martin M. Antimicrobial resistance in enteric porcine *Escherichia coli* strains in Spain. *Vet Rec* 2000;146:703-705.
79. McLaren AC. Alternative materials to acrylic bone cement for delivery of depot antibiotics in orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;427:101-106.
80. Meunier D, Acar JF, Martel JL et coll. A seven-year survey of susceptibility to marbofloxacin of pathogenic strains isolated from pets. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;24:592-598.
81. Miclau T, Dahners LE, Lindsey RW. *In vitro* pharmacokinetics of antibiotic release from locally implantable materials. *J Orthop Res.* 1993;11:627-632.
82. Morley PS, Apley MD, Besser TE et coll. Antimicrobial drug use in veterinary medicine. *J Vet Intern Med.* 2005;19:617-629.
83. Naruhashi K, Tamai I, Inoue N et coll. Active intestinal secretion of new quinolone antimicrobials and the partial contribution of P-glycoprotein. *J Pharm Pharmacol.* 2001;53:699-709.
84. National Committee for Clinical Laboratory Standards. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests fo Bacteria Isolated from Animals; approved standard M31-S1. Villanova, PA, 2004.
85. Naylor PT, Myrvik QN, Gristina A. Antibiotic resistance of biomaterial-adherent coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. *Clin Orthop Relat Res.* 1990;261:126-133.
86. Nelson CL. The current status of material used for depot delivery of drugs. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;427:72-78.
87. Nelson CL, Griffin FM, Harrison BH et coll. *In vitro* elution characteristics of commercially and noncommercially prepared antibiotic PMMA beads. *Clin Orthop.Relat Res.* 1992;284:303-309.

88. Nelson CL, McLaren SG, Skinner RA et coll. The treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of calcium sulfate tobramycin pellets. *J Orthop Res.* 2002;20:643-647.
89. Nielsen P, Gyrd-Hansen N. Bioavailability of enrofloxacin after oral administration to fed and fasted pigs. *Pharmacol.Toxicol.* 1997;80:246-250.
90. Nouws JF, Mevius DJ, Vree TB et coll. Pharmacokinetics, renal clearance and metabolism of ciprofloxacin following intravenous and oral administration to calves and pigs. *Vet Q.* 1988;10:156-163.
91. O'Brien TF. The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clin Infect Dis.* 1997;24 Suppl 1:S2-S8.
92. Olofsson SK, Marcusson LL, Komp LP et coll. Selection of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* in an *in vitro* kinetic model: relation between drug exposure and mutant prevention concentration. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:1116-1121.
93. Olson ME, Ceri H, Morck DW et coll. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res.* 2002;66:86-92.
94. Park HR, Kim TH, Bark KM. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *Eur J Med Chem.* 2002;37:443-460.
95. Pasquali F, Manfreda G. Mutant prevention concentration of ciprofloxacin and enrofloxacin against *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Vet Microbiol.* 2007;119:304-310.
96. Pechere JC. Patients' interviews and misuse of antibiotics. *Clin Infect Dis.* 2001;33 Suppl 3:S170-S173.
97. Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance. *BMJ.* 1998;317:1029-1030.
98. Piddock LJ. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs.* 1999;58 Suppl 2:11-18.

99. Prescott JF. Beta-lactam antibiotics: Penam penicillins. In: Antimicrobial therapy in veterinary medicine 3rd edition (eds. Prescott J. F., Baggot J. D., Walker R. D.). Iowa State University Press: Ames, 2000; 105-133.
100. Prescott JF, Hanna WJ, Reid-Smith R et coll. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *Can Vet J.* 2002;43:107-116.
101. Price LB, Johnson E, Vailes R et coll. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* isolates from conventional and antibiotic-free chicken products. *Environ Health Perspect.* 2005;113:557-560.
102. Ramchandani M, Robinson D. *In vitro* and *in vivo* release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants. *J Control Release.* 1998;54:167-175.
103. Ramon J, Dautrey S, Farinoti R et coll. Intestinal elimination of ciprofloxacin in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:757-760.
104. Ramos JR, Howard RD, Pleasant RS et coll. Elution of metronidazole and gentamicin from polymethylmethacrylate beads. *Vet Surg.* 2003;32:251-261.
105. Rissing JP. Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: role of the quinolones. *Clin Infect Dis.* 1997;25:1327-1333.
106. Rubinstein E, Dautrey S, Farinoti R et coll. Intestinal elimination of sparfloxacin, fleroxacin, and ciprofloxacin in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:99-102.
107. Rutledge B, Huyette D, Day D et coll. Treatment of osteomyelitis with local antibiotics delivered via bioabsorbable polymer. *Clin Orthop Relat Res.* 2003;411:280-287.
108. Sanzen L, Walder M. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci in an orthopaedic department. *J Hosp Infect.* 1988;12:103-108.
109. Sasaki S, Ishii Y. Apatite cement containing antibiotics: efficacy in treating experimental osteomyelitis. *J Orthop Sci.* 1999;4:361-369.
110. Schierholz JM, Beuth J. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *J Hosp Infect.* 2001;49:87-93.

111. Shanahan PM, Wylie BA, Adrian PV et coll. The prevalence of antimicrobial resistance in human faecal flora in South Africa. *Epidemiol Infect.* 1993;111:221-228.
112. Solberg BD, Gutow AP, Baumgaertner MR. Efficacy of gentamycin-impregnated resorbable hydroxyapatite cement in treating osteomyelitis in a rat model. *J Orthop Trauma.* 1999;13:102-106.
113. Sorum H, Sunde M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet Res.* 2001;32:227-241.
114. Steinke D, Davey P. Association between antibiotic resistance and community prescribing: a critical review of bias and confounding in published studies. *Clin Infect Dis.* 2001;33 Suppl 3:S193-S205.
115. Stelling JM, O'Brien TF. Surveillance of antimicrobial resistance: the WHONET program. *Clin Infect Dis.* 1997;24 Suppl 1:S157-S168.
116. Streppa HK, Singer MJ, Budberg SC. Applications of local antimicrobial delivery systems in veterinary medicine. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;219:40-48.
117. Taggart T, Kerry RM, Norman P et coll. The use of vancomycin-impregnated cement beads in the management of infection of prosthetic joints. *J Bone Joint Surg.Br.* 2002;84:70-72.
118. Tavio MM, Vila J, Ruiz J et coll. Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. *J Antimicrob.Chemother.* 1999;44:735-742.
119. Tenover FC. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clin Infect Dis.* 2001;33 Suppl 3:S108-S115.
120. Tetsworth K, Cierny G. Osteomyelitis debridement techniques. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;360:87-96.
121. The American Veterinary Medical Association. AAHA guidelines on the judicious use of antimicrobials in dogs. 2001. <http://www.avma.org/scienact/jtua/canine/jtuacanine.asp>

122. Thomes B, Murray P, Bouchier-Hayes D. Development of resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* on gentamicin-loaded bone cement in vivo. *J Bone Joint Surg Br.* 2002;84:758-760.
123. Thomson CJ. The global epidemiology of resistance to ciprofloxacin and the changing nature of antibiotic resistance: a 10 year perspective. *J Antimicrob Chemother.* 1999;43 Suppl A:31-40.
124. Tobias KM, Schneider RK, Besser TE. Use of antimicrobial-impregnated polymethyl methacrylate. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;208:841-845.
125. Trott DJ, Filippich LJ, Bensink JC et coll. Canine model for investigating the impact of oral enrofloxacin on commensal coliforms and colonization with multidrug-resistant *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 2004;53:439-443.
126. Tsukayama DT. Pathophysiology of posttraumatic osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;360:22-29.
127. Tunney MM, Ramage G, Patrick S et coll. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from orthopedic implants following revision hip surgery. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:3002-3005.
128. Turnidge J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Drugs.* 1999;58 Suppl 2:29-36.
129. Turnidge J. Antibiotic use in animals--prejudices, perceptions and realities. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:26-27.
130. Van de Belt H, Neut D, Schenk W et coll. *Staphylococcus aureus* biofilm formation on different gentamicin-loaded polymethylmethacrylate bone cements. *Biomaterials.* 2001;22:1607-1611.
131. Van de Belt H, Neut D, Schenk W et coll. Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review. *Acta Orthop Scand.* 2001;72:557-571.

132. Van den Bogaard AE, Willems R, London N et coll. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49:497-505.
133. Van Heijenoort J. Mécanismes moléculaires de la bactéricidie : Beta-lactamines. In: *Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques.* (eds. Courvalin P., Drugeon H., Flandrois J.-P., Goldstein F.). Editions Maloine: Paris, 1990; 13-22.
134. Wahlig H, Dingeldein E. Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. *Acta Orthop Scand.* 1980;51:49-56.
135. Walker RD. Fluoroquinolones. In: *Antimicrobial therapy in veterinary medicine* 3rd edition (eds. Prescott J. F., Baggot J. D., Walker R. D.). Iowa State University Press: Ames, 2000; 315-338.
136. Weber FA, Lautenbach EE. Revision of infected total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 1986;211:108-115.
137. Wininger DA, Fass RJ. Antibiotic-impregnated cement and beads for orthopedic infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:2675-2679.
138. Wiuff C, Lykkesfeldt J, Aarestrup FM et coll. Distribution of enrofloxacin in intestinal tissue and contents of healthy pigs after oral and intramuscular administrations. *J Vet Pharmacol Ther.* 2002;25:335-342.
139. Wiuff C, Lykkesfeldt J, Svendsen O et coll. The effects of oral and intramuscular administration and dose escalation of enrofloxacin on the selection of quinolone resistance among *Salmonella* and coliforms in pigs. *Res Vet Sci.* 2003;75:185-193.
140. World Health Organization. The medical impact of antimicrobial use in food animals. Report of a WHO meeting. Berlin, Germany, 13-10-1997, 1-24.
141. World Health Organization. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Report of a WHO meeting. Geneva, Switzerland, 2-6-1998, 1-18.

142. World Health Organization. Antimicrobial resistance. 2002. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
143. World Health Organization. Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans. 2002. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs268/en/>
144. Yamaguchi H, Yano I, Saito H et coll. Pharmacokinetic role of P-glycoprotein in oral bioavailability and intestinal secretion of grepafloxacin in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;300:1063-1069.
145. Yamane K, Wachino J, Suzuki S et coll. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3354-3360.
146. Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Statistical moments in pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1978;6:547-558.
147. Yang H, Chen S, White DG et coll. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3483-3489.
148. Zhao X, Drlica K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis.* 2001;33 Suppl 3:S147-S156.
149. Zhou J, Dong Y, Zhao X et coll. Selection of antibiotic-resistant bacterial mutants: allelic diversity among fluoroquinolone-resistant mutations. *J Infect Dis.* 2000;182:517-525.

LISTE DES ANNEXES

Chapitre premier :

Annexe 1 : Mutations des sous-unités GyrA et GyrB de l'ADN-gyrase et des sous-unités par cet
ParE de la topoisomérase IV associées aux résistances aux fluoroquinolones chez *E. coli*.
..... xvii

Annexe 2 : Systèmes d'efflux associés aux résistances aux fluoroquinolones. xviii

Annexe 3 : Moyens de limitation de l'émergence d'antibiorésistances. xix

Chapitre deuxième :

Annexe 4 : Grille d'évaluation de la douleur. xxii

Annexe 5 : Schématisation du protocole de recherche..... xxiii

Annexe 6 : Détermination des concentrations sériques d'enrofloxacin et de ciprofloxacine par
un procédé tandem de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse (LC-MS/MS).
..... xxiv

Annexe 7 : Articles publiés dans Le Point Vétérinaire :

L'ostéomyélite post-traumatique.....xxv

Les systèmes à libération locale contrôlée d'antibiotiques.....xxxii

Annexe 8 : Poster présenté à la journée de la recherche (St-Hyacinthe, 20 novembre 2007) :

Comparaison de la sélection de souches d'*E. coli* fécales résistantes lors d'administration
d'enrofloxacin par un système à libération locale maîtrisée et par voie musculaire chez
un modèle porcin.....xxxiii

Annexe 1 : Mutations des sous-unités GyrA et GyrB de l'ADN-gyrase et des sous-unités par cet ParE de la topoisomérase IV associées aux résistances aux fluoroquinolones chez *E. coli*.

	Position de l'acide aminé	Acide aminé du type sauvage	Acide aminé du type mutant
GyrA	67	Ala	Ser*
	81	Gly	Cys*, Asp*
	82	Asp	Gly
	83	Ser	Leu*, Trp*, Ala*
	84	Ala	Pro*
	87	Asp	Asn*, Val*, Gly, Tyr, His
	106	Gln	His*, Arg*
GyrB	426	Asp	Asn*
	447	Lys	Glu*
ParC	78	Gly	Asp*
	80	Ser	Leu*, Ile, Arg
	84	Glu	Lys*, Gly, Val
ParE	445	Leu	His*

* Acides aminés pour lesquels les données génétiques supportent un rôle de cette mutation dans l'induction de résistance. Les autres mutations d'acides aminés ont été associées avec une résistance dans des échantillons cliniques.

(D'après [54])

Annexe 2 : Systèmes d'efflux associés aux résistances aux fluoroquinolones.

Species	Mutant Class	Pump Components	Pump Class	Additional Resistance Phenotype
Gram-negative bacteria				
<i>E. coli</i>	<i>marR, soxS, robA</i>	AcrAB-TolC	RND	Tetracycline, chloramphenicol
	<i>emrR</i>	EmrAB	MFS	CCCp, organomercurials, nalidixic acid
<i>P. aeruginosa</i>	<i>mexR (nalB, cxB)</i>	MexAB-OprM	RND	Tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim
	<i>nfxB</i>	MexCD-OprJ	RND	Erythromycin, trimethoprim
	<i>nfxC</i>	MexEF-OprN	RND	Chloramphenicol, trimethoprim, imipenem
Gram-positive bacteria				
<i>S. aureus</i>	<i>flqB</i>	NoiA	MFS	Ethidium, acriflavine, rhodamine 6G, puromycin
<i>B. subtilis</i>	<i>bmrR</i>	Bmr	MFS	Ethidium, acriflavine, rhodamine 6G, TPP
	<i>bltR</i>	Blt(-BltD)	MFS	Ethidium, acriflavine, rhodamine 6G, TPP
Mycobacteria <i>M. smegmatis</i>	?	LfrA	MFS	Ethidium, acriflavine, quaternary ammoniums

(D'après [54])

Annexe 3 : Moyens de limitation de l'émergence d'antibiorésistances.

Usage rationnel des antibiotiques

Un usage adéquat des antibiotiques correspond à une utilisation (1) uniquement lorsque nécessaire ; (2) avec un antibiotique adapté : le spectre d'action doit être en accord avec les résultats d'examens bactériologiques et les objectifs thérapeutiques et la diffusion tissulaire doit être adaptée à l'organe cible ; (3) avec un plan thérapeutique optimal : ceci implique une dose, une fréquence, une voie d'administration et des conditions d'administration optimales ainsi qu'une durée aussi faible que microbiologiquement nécessaire ; (4) de manière à ne pas causer de toxicité chez l'animal traité [100,121].

Malheureusement, l'usage inapproprié des antibiotiques est considéré comme la cause principale d'émergence de résistance et ce, malgré l'existence de règles de conduite [46,62,96,142,143]. Les raisons de ce mésusage sont simples : (1) avec l'augmentation des antibiorésistances, les cliniciens préfèrent recourir aux nouvelles générations d'antibiotiques à large spectre ; (2) avec l'accroissement du nombre de personnes immuno-sensibles (personnes âgées, personnes atteintes du VIH, etc.), les cliniciens sont plus enclins à prescrire des antibiotiques à large spectre pour le traitement empirique d'infections présumées ; (3) les cliniciens tendent à sur-interpréter les implications d'une colonisation bactérienne [46]. Ainsi, la peur plus que la raison gouverne trop souvent l'usage des antibiotiques.

Face à ce problème, de nombreux organismes ont établi certaines recommandations [82,121,142] :

- La vente des antibiotiques devrait être restreinte de manière à ce que leur usage ne puisse se faire que par un vétérinaire ou sous son contrôle explicite. En effet, une étude montre la possibilité de se procurer des antibiotiques sans ordonnance dans plusieurs pays [96,143].

- Chaque traitement devrait être strictement réalisé selon la prescription du vétérinaire. Une étude suggère que les propriétaires pourraient jouer un rôle conséquent dans le mésusage des antibiotiques en faisant pression sur le médecin pour obtenir ces derniers, en ne respectant pas les fréquences et durées de traitement et en gardant les antibiotiques restant pour un usage ultérieur [96]. La modification de ces comportements passe par une meilleure information du public sur les caractéristiques de l'antibiothérapie et les conséquences d'un non respect des prescriptions.

- Les divers organismes vétérinaires devraient promouvoir un usage conservateur des antibiotiques, ceci par la sensibilisation des étudiants vétérinaires et des praticiens aux principes scientifiques régissant l'usage des antibiotiques.
- Les vétérinaires devraient identifier les scénarios d'utilisation d'antibiotique les plus communément rencontrés et les évaluer afin de s'assurer qu'ils minimisent leur recours lorsque possible et les utilisent de manière adéquate lorsque nécessaire.
- Les vétérinaires devraient soumettre des prélèvements appropriés pour examen bactériologique lorsque cela est possible afin de cibler leur antibiothérapie.
- L'antibio-prophylaxie devrait être réservé aux situations réellement à risque et être réalisée avec un antibiotique de première ligne. Ainsi, l'administration d'antibiotique n'est pas systématiquement nécessaire lors de chirurgie, de procédure diagnostique invasive, etc.
- Les laboratoires d'analyse devraient adopter un langage standardisé, notamment concernant le rapport des bactéries de la flore normale, en nombre normal occupant une niche biologique normale. Les vétérinaires devraient également interpréter cette donnée de manière adéquate et ne pas se baser dessus pour initier une antibiothérapie qui serait inutile.
- Les organismes vétérinaires devraient encourager les firmes pharmaceutiques à commercialiser leurs antibiotiques sur des bases scientifiques, notamment concernant leur efficacité et leurs effets secondaires, et de promouvoir leur usage conservateur.

Prévention de la dissémination

La dissémination de souches résistantes intervient primitivement par une transmission de patient à patient, lorsque les règles de base de désinfection ne sont pas respectées. Malgré les efforts réalisés dans les hôpitaux, qu'ils soient humains ou vétérinaires, ceux-ci apparaissent comme le lieu de prédilection de dissémination bactérienne. Les raisons sont multiples : la densité de population, et notamment de patients immuno-sensibles, le non-respect systématique des règles de désinfection par les patients et le personnel soignant, le sous-effectif éventuel du personnel soignant et la présence accrue de matériel contaminé (sondes endotrachéales, cathéters urinaires, etc.) [46,142]. L'accent doit donc être mis sur le respect systématique des techniques d'asepsie et d'hygiène générale, l'établissement de méthode de « barrière » aux disséminations et la minimisation des temps d'hospitalisation [46,64,91]. Idéalement, les besoins spécifiques de

chaque structure devraient être évalués par une équipe de consultants spécialisés dans ce domaine et les solutions adaptées aux circonstances [46].

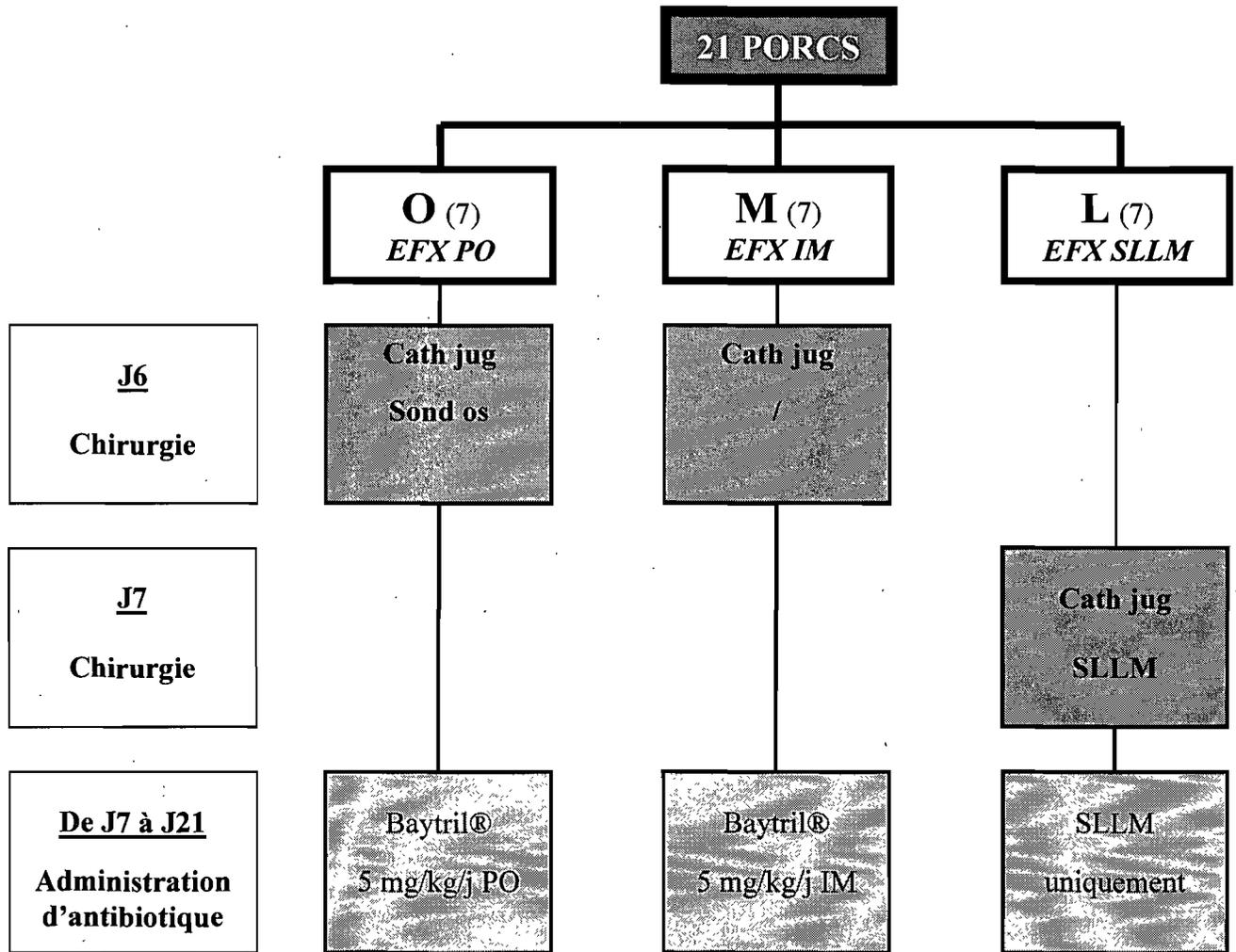
Il est également important qu'une surveillance mondiale vienne se superposer à la gestion locale des antibiorésistances. À cette fin, le programme WHONET mis en place par l'OMS, permet la récolte, la standardisation et la comparaison des données provenant de dizaines de milliers de laboratoires dans le monde. L'analyse de cette importante banque de données devrait aboutir à un meilleur suivi et compréhension de la dynamique des populations bactériennes [115,142].

Annexe 4 : Grille d'évaluation de la douleur.

Critères	Description	Score	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
Boiterie	Légère boiterie	1							
	Boiterie modérée, mouvements lents	2							
	Boiterie importante, faibles mouvements	3							
	Immobile ou boiterie sévère	4							
Agitation	Ne peut dormir correctement	1							
	Faible temps de sommeil bouge souvent	2							
	Déambule souvent, s'arrête temporairement	3							
	Déambule continuellement dans cage	4							
Vocalisation	Faible volume, cris occasionnels	1							
	Faible volume, cris continus	2							
	Volume élevé, cris assez fréquents	3							
	Cris durant une longue période	4							
Apparence	Pupilles légèrement dilatées	1							
	Pupilles dilatées	2							
	Pupilles dilatées et salivation fréquente	3							
Interaction	S'éloigne légèrement lorsqu'approché	1							
	Saute "partout" lorsqu'approché	2							
Agression	Assez amical	1							
	A tendance à s'éloigner	2							
	Mord et crie lorsque touché	3							
	Mord et crie sans être touché	4							
Posture	Légèrement voûté	1							
	Protège le membre affecté	2							
	Agenouillé et se déplace difficilement	3							
	Immobile ou agenouillé	4							
Posture	Joue un peu	1							
	Aucun intérêt pour les jouets	2							
	Ne joue / bouge pas beaucoup	3							
Température	Changement de 1°C	1							
Fréquence respiratoire	Augmentation de 20 à 50 %	1							
	Augmentation de 50 - 100 %	2							
	Augmentation de plus de 100 %	3							
Fréquence cardiaque	Augmentation de 20 à 50 %	1							
	Augmentation de 50 - 100 %	2							
	Augmentation de plus de 100 %	3							
TOTAL		37							

SCORE TOTAL : 0 = pas de douleur, 1-12 = douleur légère, 12-25 = douleur modérée, 25-37 = douleur importante

Annexe 5 : Schématisation du protocole de recherche.



Cath jug : Cathéter jugulaire, Sond os : Sonde d'oesophagostomie.

Annexe 6 : Détermination des concentrations sériques d'enrofloxacin et de ciprofloxacine par un procédé tandem de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

L'enrofloxacin, la ciprofloxacine and la réserpine ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Ils ont été dissouts dans du méthanol à une concentration de 100 µg/mL. Les autres produits, incluant le méthanol, l'acétonitrile et l'acide formique ont été achetés chez J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

Le système HPLC était composé d'un Perkin Elmer serie 200 autosampler et d'un Thermo Separation System P2000. Le système LC-MS/MS utilisé était un PESCiex API 3⁺. Les données étaient acquises sur un Apple™ Macintosh® équipé du système d'exploitation 7.4. L'acquisition et l'analyse des données étaient réalisées avec MassChrom 1.0. Les courbes de calibration étaient calculées d'après l'équation $y = ax + b$, tel que déterminé par la régression linéaire pondérée (1/x) de la ligne de calibration construite à partir des ratios pic-aire du produit et des standards internes. À l'aide d'une simple méthode de précipitation de protéine, l'enrofloxacin et la ciprofloxacine étaient extraites du plasma porcin. Un échantillon total de 100 µL était mélangé avec 500 µL d'acétonitrile (contenant 250 ng/mL de réserpine) dans un tube à centrifugation de 1.5 mL. Les échantillons étaient remués vigoureusement puis laissés 10 min à température ambiante avant centrifugation. Les échantillons étaient centrifugés à environ 12 00 g pendant 10 min et 1000 µL du surnageant étaient transférés dans un tube à HPLC. Une phase mobile isocratique était utilisée avec un Waters Symmetry C18 150 x 3.9 mm avec une taille de particule de 5 µm. La phase mobile était constituée d'acétonitrile et d'acide formique 0.5% dans de l'eau à un ratio 80:20, respectivement. Le débit était fixé à 0.8 mL/min et l'enrofloxacin et la ciprofloxacine éluées à 1.2 and 1.3 min respectivement. Le débit de la colonne était divisé 1:10 avant introduction dans la source d'électrospray. Dix µL de l'échantillon extrait était injecté et la durée totale était fixée à 2 min.

Le spectromètre de masse était interfacé avec le système HPLC à l'aide d'une source d'ionisation par électrospray pneumatique. La pression en N₂ du gaz nébulisant était fixée à 40 psi et l'électrode ESI à 4500V. La nébulisation était assistée avec du gaz nitrogène chauffé avec un débit fixé à 3 L/min et à 400°C. Le potentiel de séparation était fixé à 15V et l'énergie de collision (E_{lab}) à 25V. Le gaz de collision utilise était l'argon à 2.7×10^{14} molécules/cm². Les transitions SRM étaient m/z 360→316, 332→245 and 609→174 pour l'enrofloxacin, la ciprofloxacine et la réserpine respectivement. Le temps de maintien était fixé à 150msec et le temps de pause à 5 msec.

Annexe 7 : Articles publiés dans Le Point Vétérinaire

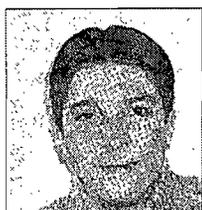
INFECTION OSSEUSE CHEZ LE CHIEN ET CHEZ LE CHAT

L'ostéomyélite post-traumatique

Les ostéomyélites sont des affections peu fréquentes chez le chien et chez le chat, mais difficiles à traiter. L'évolution des connaissances et l'utilisation de nouvelles techniques thérapeutiques améliorent leur pronostic.

Résumé

Les ostéomyélites post-traumatiques chroniques sont le plus souvent des infections simples d'origine bactérienne (en particulier *Staphylococcus spp.*), mais des bactéries anaérobies sont fréquemment retrouvées lors d'infection polymicrobienne. Les facteurs de risque sont une contamination initiale, la présence d'un corps étranger et un environnement favorable à la multiplication bactérienne. L'ostéomyélite post-traumatique concerne le squelette appendiculaire dans 90 % des cas. Le diagnostic repose sur des examens cliniques, radiologiques et bactériologiques. Le traitement est à la fois chirurgical (exploration, débridement du site, oblitération des espaces morts, greffe d'os spongieux, ablation du matériel d'ostéosynthèse, etc.) et médical (antibiothérapie systémique et/ou locale). Il permet d'obtenir des taux de guérison de 80 à 90 %, mais reste néanmoins long et coûteux à instaurer.



par Romain Beraud*

et Louis Huneault*

* Centre hospitalier universitaire vétérinaire, université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, CP 5000, Saint-Hyacinthe QC J2S 7C6

Par définition, l'ostéomyélite est une inflammation de l'os (moelle osseuse, cortex et éventuellement périoste) causée par un agent infectieux. Il existe de nombreuses classifications qui reposent sur plusieurs critères, comme le mode d'évolution du processus (aigu ou chronique), l'étendue de l'affection (diffuse ou localisée) ou son origine (hématogène, par contiguïté ou post-traumatique). La classification établie par Cierny et Mader en médecine humaine semble être la plus complète. Elle prend en compte le type anatomique d'ostéomyélite et la classe physiologique de l'animal (voir le TABLEAU "Classification des ostéomyélites selon Cierny et Mader") et permet ainsi d'associer un protocole thérapeutique à chaque stade [11, 12].

• L'ostéomyélite de stade 1 correspond à une infection confinée aux surfaces intramédullaires de l'os.

Elle résulte en général d'une infection par voie hématogène ou de la contamination de clous intramédullaires utilisés lors d'une intervention chirurgicale.

Les ostéomyélites hématogènes correspondent à environ 10 % de ces cas et concernent plus fréquemment les jeunes animaux que les adultes, avec une atteinte des métaphyses des os longs [6, 12].

• Lors d'ostéomyélite de stade 2 (ou ostéomyélite superficielle ou ostéomyélite par foyer contigu), le périoste et le cortex superficiel sont infectés par une plaie sceptique adjacente (plaie de morsure, de décubitus, etc.). La majorité des animaux atteints présentent des facteurs prédisposants locaux.

• Les ostéomyélites de stades 3 et 4 sont généralement désignées sous le terme d'ostéomyélite post-traumatique (OMPT).

Le stade 3, ou OMPT localisée, est caractérisé par la présence d'un séquestre osseux focal qui implique toute l'épaisseur de la corticale, mais qui peut être retiré chirurgicalement sans affecter la stabilité de l'os.

Le stade 4, ou OMPT diffuse, implique également toute l'épaisseur de l'os cortical, mais concerne une zone plus étendue que le stade 3. Cette ostéomyélite est davantage débilatante car elle est généralement associée à une perte de la stabilité osseuse et un débridement osseux large est requis.

Caractéristiques générales et épidémiologie

L'OMPT correspond au type d'ostéomyélite le plus fréquemment rencontré en médecine humaine et vétérinaire [6, 21]. Elle survient classiquement à la suite d'un traumatisme osseux accidentel ou chirurgical. Les réductions de fractures ouvertes par balle ou qui font suite à un accident de la voie publique ou à une chute, les morsures profondes, la mise en place d'une prothèse totale de hanche ou d'allogreffes corticales sont autant d'exemples de situations à risque.

La plupart des OMPT (90 %) sont localisées au niveau du squelette appendiculaire (voir la FIGURE "Principales localisations des lésions d'ostéomyélite post-traumatique chez le chien"). La couverture musculaire des membres est en effet limitée et ceux-ci sont plus fréquemment impliqués dans les fractures.

Les cas d'OMPT concernent respectivement 64 % et 36 % des mâles et des femelles. Cette prédisposition peut être liée au fait que les fractures sont plus fréquentes chez les premiers [4]. L'âge et la race ne semblent pas être des facteurs prédisposants [4].

L'OMPT n'est pas une affection systémique, contrairement à l'ostéomyélite hématogène, et le processus est généralement localisé à l'os ou aux os qui ont subi un traumatisme [1]. Exception faite des segments osseux distaux (métacarpes, métatarses et phalanges), l'OMPT n'implique en général qu'un seul os [4].

Physiopathologie de l'OMPT

1. Nature de l'agent infectieux

La plupart des ostéomyélites sont d'origine bactérienne, même si de rares cas d'ostéomyélite d'origine virale ou mycosique sont rapportés (voir le TABLEAU "Principaux agents bactériens impliqués lors d'ostéomyélite post-traumatique chez le chien"). L'OMPT résulte en général d'une infection monobactérienne (ou simple). Un seul type de micro-organisme est en effet isolé dans 53 % des cas d'OMPT, deux dans 31 % et trois dans 15 % des cas [1].

L'agent principal est *Staphylococcus* spp. (*S. intermedius* et *aureus*) retrouvé dans 45 à 74 % des cas [1, 6, 8]. *Streptococcus* spp. et des bactéries Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. et *Klebsiella* spp.) sont également rencontrés [1, 6, 8].

Des agents anaérobies (*Actinomyces* spp., *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp.) sont rarement présents lors d'infection simple, mais sont retrouvés dans près de 70 % des OMPT polymicrobiennes [8].

2. Conditions d'évolution

La seule présence d'un agent bactérien n'est pas suffisante pour entraîner le développement d'une OMPT. De 60 à 70 % des fractures ouvertes chez l'homme sont contaminées par des bactéries, mais seule une faible fraction d'entre elles sont le site d'une infection osseuse [21]. Trois éléments concomitants sont généralement rencontrés lors de l'évolution d'une OMPT (voir la FIGURE "Représentation schématique de la pathogénie de l'ostéomyélite post-traumatique") :

- une plaie infectée qui se définit comme une plaie contaminée par un nombre d'agents bactériens supérieur à 10^8 colonies formant unité (CFU) depuis un temps suffisant pour leur permettre de se multiplier de manière exponentielle. Une plaie contaminée est considérée comme infectée entre 12 et 24 heures environ après la contamination initiale. Celle-ci est principalement due à une mauvaise technique opératoire et, moins fréquemment, à une contamination environnementale (fracture ouverte, etc.) [1, 4] ;

- un environnement favorable à la croissance bactérienne : en effet, la plupart des bactéries peuvent subsister dans un environnement non optimal, mais nécessitent des conditions spécifiques favorables pour se multiplier. Des hématômes (le sang stagnant est un excellent milieu de culture bactérienne) ou des tissus nécrosés ou fibrosés auxquels les bactéries peuvent facilement adhérer ou un foyer de fracture instable (les micromouvements continus entravent la revascularisation des extrémités des abuts osseux) sont des milieux favorables au développement bactérien ;
- un corps étranger (séquestres osseux, implant orthopédique) isolé des mécanismes de défense de l'hôte et de la diffusion des antibiotiques [1, 8, 11, 12, 21].

Une étude qui rapporte les taux d'OMPT à la suite de l'injection de *S. aureus* dans un tibia normal après le forage expérimental d'un trou montre que la seule présence de 10^8 CFU de bactéries conduit à 0 % d'OMPT. Lors de traumatisme du canal médullaire associé, ce taux s'élève à 50 %, avec une résolution spontanée de 95 % des cas en quatre semaines. Lorsque le traumatisme médullaire est accompagné de la création d'un séquestre et d'une présence bactérienne, le taux d'OMPT est de 90 % [1].

3. Pathogénie

- Après la contamination d'une plaie, les agents bactériens responsables d'une infection doivent adhérer aux tissus de l'hôte pour proliférer. Cela

est rendu possible par l'exposition du collagène et par la présence de fibronectine à la surface des tissus traumatisés, contrairement aux tissus sains, car certaines bactéries (notamment les bactéries Gram positif dont *S. aureus*) possèdent des récepteurs spécifiques pour ces protéines [5, 21].

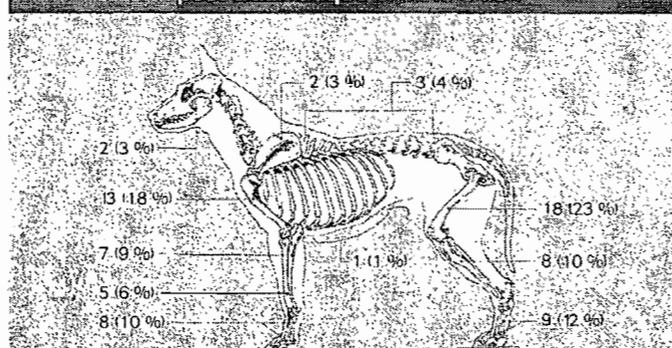
- La présence d'implants orthopédiques, comme celle de tout autre corps étranger (tissus mous et osseux avasculaires), favorise également

Classification des ostéomyélites selon Cierny et Mader

Classification	Description
Type anatomique d'ostéomyélite	
Stade 1	Ostéomyélite médullaire
Stade 2	Ostéomyélite superficielle
Stade 3	Ostéomyélite localisée
Stade 4	Ostéomyélite diffuse
Statut physiologique de l'hôte atteint	
Hôte A	Bon état de santé général Absence de facteurs de risque
Hôte B	Bs : facteur de risque infectieux systémique : Malnutrition, insuffisance rénale ou hépatique, diabète sucré, hypoxie chronique, maladie auto-immune, immunodépression ou déficience immunitaire, âge Bl : facteur de risque infectieux local : Lymphœdème chronique, stase veineuse, atteinte majeure des vaisseaux sanguins, artérite, cicatrisation extensive, fibrose de radiation, neuropathie
	Bls : facteur de risque infectieux systémique et local : Association de facteurs systémiques et locaux
Hôte C	La morbidité liée au traitement envisagé est supérieure à celle de l'affection

Cette classification repose sur la localisation anatomique de l'infection, l'état des défenses immunitaires de l'hôte et son degré d'invalidité. Le stade est déterminé sans considérer l'étiologie, le site ou la durée du processus pathologique, même s'il existe cliniquement une grande corrélation entre les causes et le stade attribué. La classe physiologique de l'hôte intervient principalement dans l'anticipation de l'évolution du processus infectieux. Un hôte qui présente des facteurs de risque locaux ou systémiques (hôte B) ne luttera pas aussi efficacement contre la propagation de l'infection qu'un hôte en bonne santé (hôte A). La présence de ces facteurs peut également prédisposer au développement d'une ostéomyélite. D'après [11].

Principales localisations des lésions d'ostéomyélite post-traumatique chez le chien



La figure représente la localisation de 76 lésions chez 67 chiens atteints d'ostéomyélite post-traumatique (d'après [14]).

En savoir plus

- Béraud R, Huneault L.
Les systèmes à libération locale
contrôlée d'antibiotiques
chez le chien et le chat, *Point Vét.*
2005, 36(1261): 12-13.

l'adhésion des bactéries car ils sont rapidement recouverts d'une matrice composée de protéines sériques, de fibronectine, de laminine et d'autres protéines. Les bactéries adhèrent à cette matrice et produisent un limon composé d'exopolysaccharides, d'ions et d'autres nutriments, et l'ensemble forme un biofilm bactérienne lors d'ostéomyélite post-traumatique [6, 17, 21]. Ce biofilm est composé de deux populations bactériennes. Une population planctonique est active en surface alors qu'une population sessile, à l'origine des infections asymptomatiques chroniques [18], est ancrée dans l'épaisseur. La présence de ce biofilm a diverses conséquences :

- il protège les bactéries en les isolant du système immunitaire de l'hôte et de la diffusion des antibiotiques ;
- il ralentit leur métabolisme et leur confère une résistance accrue aux antibiotiques ;
- il permet le phénomène de variation de phase, qui correspond à un ensemble de mécanismes

de régulation génétique. L'expression d'un gène varie rapidement de façon réversible de génération en génération [5, 17, 18, 21].

L'influence du biofilm sur l'évolution de l'infection est telle que certaines études proposent d'établir expérimentalement les concentrations minimales d'éradication dans le biofilm plutôt que les CMI [16].

Lors d'un traumatisme, la réponse inflammatoire de l'hôte est aiguë et caractérisée par une vasodilatation locale, une augmentation de la perméabilité vasculaire, un œdème tissulaire, une diapédèse des leucocytes et une capacité accrue des polymorphonucléaires et des macrophages à phagocyter les bactéries [21]. Après cette phase aiguë, un phénomène inflammatoire chronique débute et mène à la formation d'une capsule et d'un abcès chronique qui inclut, le cas échéant, le(s) séquestre(s) infecté(s).

L'accumulation progressive d'exsudat purulent entraîne une augmentation locale de la pression qui favorise la pénétration et la propagation de cet exsudat à travers les canaux haversiens ou de Volkmann de la trame osseuse.

Principaux agents bactériens impliqués lors d'ostéomyélite post-traumatique chez le chien

Bactéries aérobies	Bactéries anaérobies
Gram positif	
<i>Staphylococcus intermedius/aureus</i>	<i>Actinomyces</i> spp.
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
Gram négatif	<i>Fusobacterium</i> spp.
<i>Escherichia coli</i>	<i>Clostridium perfringens/villosum</i>
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Peptostreptococcus</i> spp.
<i>Proteus</i> spp.	<i>Propionobacterium</i> spp.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Peptococcus</i> spp.
<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Fusonecrophorum</i> spp.
<i>Senatia marcescens</i>	<i>Fusonucleatum</i> spp.
Autres	Autres

Diagnostic

Aucune méthode diagnostique n'est assez sensible pour permettre à elle seule d'identifier une ostéomyélite [1, 2, 11, 12]. Le diagnostic est établi à partir de différentes données qui incluent l'interprétation du clinicien.

1. Signes cliniques

Les signes cliniques varient en fonction du stade du processus, mais restent généralement locaux et d'apparition lente : érythème, gonflement des tissus mous qui persiste plusieurs semaines après le traumatisme initial, douleur à la palpation, boiterie, atrophie, fibrose et contracture musculaire.

La présence de trajets fistulaires qui se referment après un traitement antibiotique et se réactivent de manière cyclique à l'arrêt du traitement est le signe clinique le plus fréquemment rapporté [1, 8, 12].

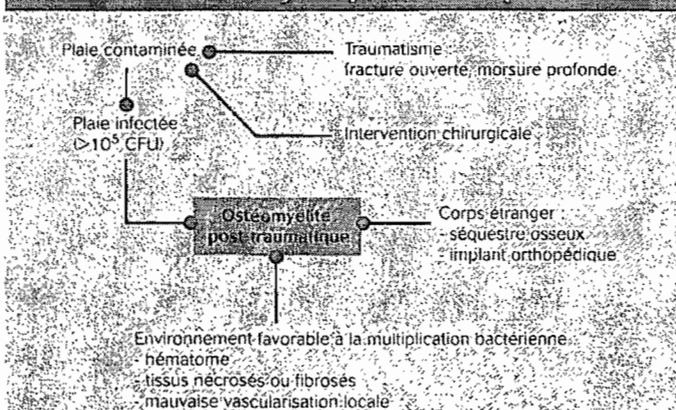
Des signes systémiques tels qu'abaîtement, fièvre, anorexie sont davantage caractéristiques d'une OMPT en phase aiguë [6].

2. Imagerie médicale

La radiographie est une technique de diagnostic peu invasive qui présente une sensibilité et une spécificité moyennes (62,5 et 57,1% respectivement) [2].

Les modifications radiographiques fréquemment observées lors d'ostéomyélite sont une lyse osseuse, une réaction périostée plus ou moins spiculée et un gonflement des tissus mous plus ou moins marqué (PHOTO 1). La présence d'un séquestre (*involucrum*) entouré d'os sain (*involucrum*) est caractéristique, mais pas systématique (PHOTOS 2, 3a ET 3b). Lors d'ostéosynthèse, une non-union, un retard de consolidation osseuse ou une lyse osseuse autour des implants orthopédiques (généralement les vis et les broches) peuvent également constituer des signes d'OMPT.

Représentation schématique de la pathogénie de l'ostéomyélite post-traumatique



ID après [1].

Les signes radiographiques osseux reflètent l'état de l'ostéomyélite avec un retard de deux à trois semaines. Ils sont parfois difficiles à interpréter car ils peuvent mimer une guérison osseuse normale. Des radiographies de contrôle sont réalisées à quelques semaines d'intervalle afin de juger de l'évolution du processus.

- Si un trajet fistulaire est présent, la réalisation d'une fistulographie apporte souvent des informations précieuses pour le débridement chirurgical. Il est préférable que ce dernier inclut l'excision du trajet fistulaire.

- La tomodensitométrie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) permettent parfois de visualiser des foyers plus denses dans la moelle osseuse, qui correspondent à un signe précoce d'ostéomyélite. Le scanner et l'IRM offrent également la possibilité d'évaluer l'extension du processus et constituent une aide à la planification préopératoire [12, 20].

- La scintigraphie au technétium 99m, bien que peu spécifique, peut confirmer la présence d'une zone d'activité métabolique anormalement élevée.

3. Bactériologie

La culture bactérienne est actuellement la technique la plus sensible pour diagnostiquer une ostéomyélite [1, 6, 8, 12]. L'administration d'antibiotiques doit être arrêtée pendant les 24 à 48 heures qui précèdent le prélèvement.

Celui-ci est réalisé directement sur le site d'ostéomyélite car les zones plus superficielles (trajets fistulaires) sont fréquemment contaminées par des organismes opportunistes secondaires. Une étude en médecine humaine rapporte la présence de l'agent causal dans seulement 44 % des prélèvements effectués sur les fistules [14]. Les tissus nécrosés, les séquestres, le matériel purulent et les implants

orthopédiques retirés sont d'excellents échantillons et sont classiquement récoltés durant l'intervention chirurgicale. Le prélèvement est effectué avant ou pendant le débridement, soit directement par récolte des tissus, soit à l'aide d'écouvillons stériles.

Les prélèvements peuvent également être réalisés par aspiration à l'aiguille fine. La sensibilité de cette technique est bonne (86 % de mise en évidence de l'agent causal) [6]. Le site de ponction est préparé de manière stérile, une aiguille de 20 G est insérée jusqu'au niveau de l'os, en regard du site d'OMPT suspecté, et une aspiration est réalisée à l'aide de la seringue. Si la quantité de fluide récolté est insuffisante, quelques millilitres de NaCl 0,9 % peuvent être injectés, puis réaspirés.

Les prélèvements sont ensuite mis en culture sur milieux aérobie et anaérobie, puis un antibiogramme est réalisé.

4. Histopathologie

Les examens histopathologiques sont spécifiques (86,3 %), mais ils sont rarement réalisés car la technique est invasive et peu sensible (33,3 %) [2]. Des prélèvements peuvent néanmoins être effectués à la faveur du débridement chirurgical (morceau d'os dévascularisé, tissu nécrotique, etc.) et analysés.

Traitement

Le traitement de l'OMPT a pour objectif d'améliorer l'environnement du site infecté afin d'augmenter son exposition au système immunitaire de l'hôte et aux antibiotiques. Il comprend deux volets indissociables, l'un est chirurgical, l'autre est médical.

Points forts

- L'ostéomyélite post-traumatique est la plus fréquente des ostéomyélites.

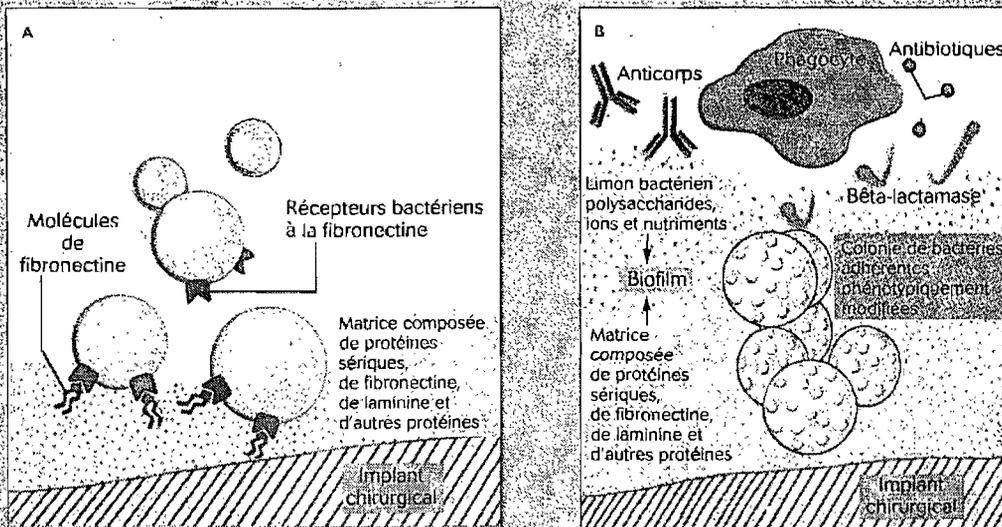
- Les ostéomyélites post-traumatiques chroniques sont presque exclusivement d'origine bactérienne et *Staphylococcus* spp. est l'agent majoritairement retrouvé.

- L'existence d'une plaie contaminée par plus de 10^6 CFU bactéries, la présence d'un corps étranger et d'un environnement favorable à la croissance bactérienne sont les trois facteurs d'apparition d'une ostéomyélite post-traumatique. Si l'un ou deux de ces facteurs sont éliminés, le risque de développer une ostéomyélite est diminué. Si les trois sont prévenus, le risque devient nul.

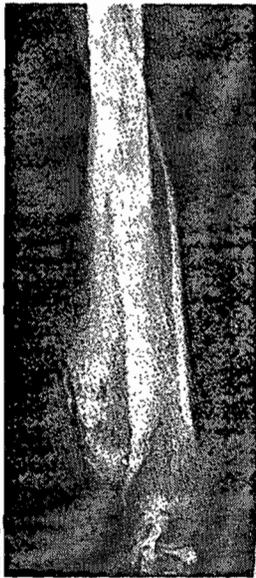
- La mise en place de systèmes à libération locale maîtrisée d'antibiotique présente une efficacité prophylactique et thérapeutique prouvée.

- La qualité du débridement est le facteur essentiel du traitement chirurgical.

Mécanisme de persistance bactérienne lors d'ostéomyélite post-traumatique

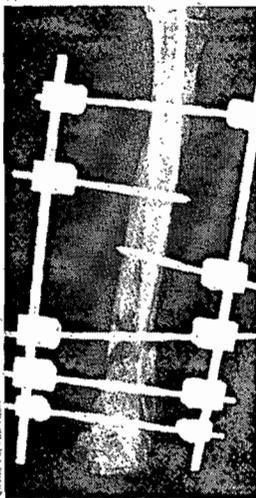


(A) Un corps étranger (par exemple un implant orthopédique) est recouvert d'une matrice qui contient de la fibronectine permettant la liaison de bactéries. (B) Les staphylocoques et autres bactéries qui ont adhéré produisent un limon qui, associé à la matrice bactérienne, forme un biofilm. Celui-ci accroît l'adhérence bactérienne, protège les bactéries des phagocytes et anticorps, et peut contenir des bêta-lactamases. Certaines bactéries peuvent également se transformer, phénotypiquement en souches plus virulentes. (d'après [8]).



Cliche : L. Harreval

PHOTO 1. Radiographie de face d'un radius/ulna de chien qui présente une ostéomyélite de l'ulna à la suite d'une morsure. Une lyse osseuse légère ainsi qu'une réaction périostée et un remodelage osseux marqués sont observés.



Cliche : L. Harreval

PHOTO 2. Radiographie de contrôle du radius/ulna d'un chien présenté pour fracture ouverte de type I. Une résorption osseuse marquée est observée sur les bouts osseux et un fragment osseux est présent sur le radius. Ces phénomènes sont caractéristiques d'une ostéomyélite. La prolifération périostée est en revanche ici minimale.

1. Traitement chirurgical

La partie chirurgicale peut exiger un haut niveau de technicité.

• La première étape consiste en un débridement agressif qui est réalisé en apportant un soin particulier à la technique opératoire. La qualité du débridement est en effet le facteur essentiel du traitement de l'OMPT [3, 20].

Tous les tissus, mous et osseux, nécrosés et fibrosés, le matériel purulent, les fistules et les séquestres, doivent être retirés en limitant au minimum les pertes de substance. La viabilité du tissu osseux peut être évaluée subjectivement par le "signe du paprika" : le chirurgien curçite le tissu osseux jusqu'à voir apparaître au niveau de celui-ci de petits saignements ponctiformes. Cela matérialise la limite entre le tissu osseux vascularisé, et donc *a priori* sain, et le tissu nécrosé.

Une exploration complète de la plaie et des prélèvements pour culture bactérienne doivent être réalisés, pendant ou après la phase de débridement. L'antibiothérapie systémique peut être initiée à ce moment :

• Le site chirurgical est ensuite abondamment rincé (1 à 5 litres de soluté) à l'aide d'un soluté physiologique ou d'une solution à 0,05 % de chlorhexidine tiède, sous pression modérée (avec une seringue de 30 ml et une aiguille 18 G).

• Lorsque le débridement entraîne une perte de plus de 30 % du volume cortical original, une stabilisation osseuse (généralement à l'aide d'une fixation externe) est recommandée afin d'éviter d'éventuelles fractures d'origine iatrogène [20].

• Une greffe d'os spongieux peut être réalisée sur le site de débridement et permet de combler un déficit osseux marqué et d'accélérer la guérison.

• Dans la mesure du possible, le site opératoire est refermé par première intention, éventuellement à l'aide de lambeaux cutanés ou myocutanés ou de greffes libres ou microvasculaires, afin de permettre un recouvrement du site et d'améliorer sa vascularisation.

• Un drain peut être mis en place avant la fermeture du site chirurgical lorsqu'il existe de grands espaces morts, que la qualité du débridement est limitée ou lors de production massive d'exsudat. Un système de drainage actif fermé est préférable car il est efficace et limite les contaminations ascendantes.

• Lorsqu'une fermeture directe du site chirurgical est irréalisable, la plaie est laissée ouverte. La fermeture est retardée ou une cicatrisation par seconde intention est favorisée à l'aide de pansements adaptés.

• Lorsqu'une fracture est impliquée dans le processus d'ostéomyélite, la stabilité doit être vérifiée et fréquemment réévaluée car la guérison lors d'infection n'est possible que si la condition de stabilité est remplie. L'instabilité du foyer de fracture entrave en effet la revascularisation de l'extrémité des bouts osseux et crée un environnement favorable à la persistance de l'ostéomyélite [21].

Si les implants sont stables, ils peuvent être laissés en place. Les implants permettant la persistance des agents infectieux, une ablation du matériel d'ostéosynthèse (AMO) est néanmoins à prévoir après guérison osseuse complète [5, 18].

Si la fracture ou les implants sont instables, une AMO doit être réalisée et la fracture est à nouveau stabilisée (généralement à l'aide d'une fixation externe linéaire, circulaire ou hybride). Les recommandations du suivi postopératoire sont classiques (restriction d'exercice, physiothérapie, etc.).

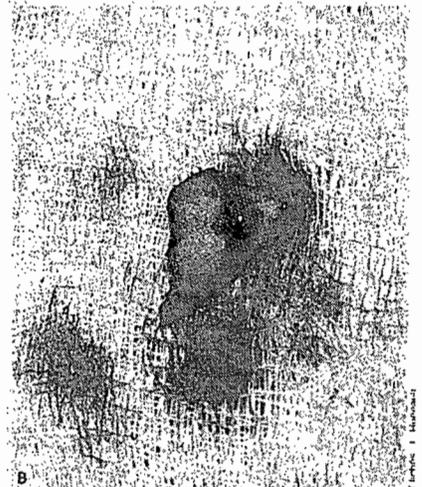
2. Traitement médical

Le traitement médical consiste en une antibiothérapie systémique ciblée et soutenue. Celle-ci ne peut en aucun cas se substituer au débridement chirurgical, sous peine d'échec ou de récurrences fréquentes.

Le choix de l'antibiotique est dicté par les résultats des cultures bactériennes et de l'antibiogramme, et repose sur des sensibilités confirmées de la bactérie.



PHOTOS 3A ET 3B. Vue peropératoire du chien présenté pour fracture ouverte de type I (même animal que sur la PHOTO 2). Le séquestre osseux est visualisé et retiré.



Cliche : L. Harreval

Avant d'obtenir les résultats, ou si ceux-ci sont négatifs, un antibiotique est choisi de façon empirique en adoptant une démarche probabiliste selon la fréquence des bactéries rencontrées et en fonction de la pénétration osseuse du médicament (voir le TABLEAU "Principaux antibiotiques utilisés par voie systémique dans le traitement des OMPT") [22]. Les pénicillines, les céphalosporines, les aminoglycosides et les quinolones sont les principales molécules utilisées. Une durée minimale de traitement de quatre à six semaines est recommandée [6, 8, 13].

Malgré une approche conventionnelle rigoureuse, le taux de réussite varie de 80 à 90 % [1, 3, 8, 20, 21]. De nouvelles méthodes de traitement ont donc été développées afin de limiter les récurrences et d'améliorer le pronostic des cas réfractaires à un traitement classique.

Les systèmes à libération locale maîtrisée (SLLM) permettent d'atteindre des concentrations locales d'antibiotique élevées, qui atteignent 200 fois celle d'un traitement parentéral [16], et pendant une durée prolongée tout en minimisant les risques de toxicité systémique [10, 19]. Ces matrices de libération sont composées d'un matériau de support, non résorbable comme le polyméthyl-méthacrylate (PMMA), le plus fréquemment utilisé, ou résorbable (plâtre de Paris, hydroxyapatite, amidon réticulé, etc.) dans lequel l'antibiotique est incorporé (PHOTO 4) [10, 19]. Les concentrations d'antibiotique locales élevées et prolongées permettent la pénétration des tissus vasculaires et des biofilms. De nombreuses études rapportent leur efficacité supérieure et leur intérêt dans le traitement et la prévention de l'OMPT [7, 15].

Prévention

Le traitement d'une ostéomyélite peut s'avérer difficile, long, coûteux et d'issue incertaine. Il convient donc de mettre l'accent sur la prévention de cette affection. L'objectif est d'éviter la survenue des trois facteurs de risque. Si l'un de ces trois composants est supprimé, il est possible d'éviter une OMPT. Si deux facteurs sont écartés, il y a de fortes chances qu'une OMPT ne se développe pas. Si les trois composants sont prévenus, le risque d'OMPT devient nul [1].

La contamination et la création d'un environnement favorable au développement bactérien entrent en jeu lors d'une intervention chirurgicale ou en présence d'une blessure. Une gestion de plaie rigoureuse et une technique chirurgicale éprouvée sont nécessaires. Elles incluent :

- une bonne asepsie ;
- une antibioprofylaxie adéquate ;
- des incisions nettes ;
- une hémostase soignée ;
- une manipulation précautionneuse et la plus atraumatique possible des tissus ;
- le retrait des corps étrangers, des tissus fibrosés et nécrosés ;
- des décisions peropératoires judicieuses (retirer un fragment osseux dévascularisé pour

Principaux antibiotiques utilisés par voie systémique dans le traitement des OMPT

Classe d'antibiotiques	Nom de la molécule	Posologie (mg/kg)	Voie(s) d'administration	Fréquence d'administration (toutes les x heures)
Fluoroquinolone	Enrofloxacin	5 à 20	SC, IM, PO	8 à 12 h
Aminoside	Gentamicine	22	IV, IM, SC	8 à 12 h
Céphalosporine	Céphalexine	22 à 30	IV, IM, SC, PO	6 à 8 h
Pénicilline	Amoxicilline	22 à 30	IV, IM, SC, PO	6 à 8 h
	Amoxicilline Acide clavulanique	11 à 22	PO	12 h
	Ampicilline	22	PO	6 à 8 h
	Pénicilline G (aqueuse)	20 000 à 40 000 UI	IV	6 h
Clindamycine	Clindamycine	11	PO	12 h

PO : par voie orale ; IV : par voie intraveineuse ; IM : par voie intramusculaire ; SC : par voie sous-cutanée.

éviter tout risque d'infection ou le garder afin de stabiliser la réparation osseuse) ;

- une stabilisation fermée des segments osseux impliqués ;
- une fermeture anatomique en limitant les espaces morts.

Une antibioprofylaxie doit être instaurée lors de toute chirurgie orthopédique qui implique la mise en place d'implants ou lorsque l'intervention chirurgicale dure plus de deux heures. La concentration tissulaire maximale en antibiotique doit être atteinte et maintenue durant toute l'intervention chirurgicale. Ainsi, une injection intraveineuse d'antibiotique est réalisée vingt minutes avant le début de l'opération chirurgicale, puis toutes les deux heures au cours de l'intervention. Il convient d'arrêter l'administration d'antibiotique dans les vingt-quatre heures qui suivent l'intervention, à moins d'être en présence d'une fracture ouverte.

La mise en place de SLLM d'antibiotique présente également une efficacité prophylactique prouvée [7]. Elle peut être une excellente option lors de situations à risque (fracture ouverte de type II ou III) ou lorsque la survenue d'une infection serait dramatique (prothèse totale de hanche). Toutefois, la disponibilité de ces systèmes est actuellement limitée.

La compréhension du processus pathogénique des ostéomyélites post-traumatiques a beaucoup progressé. Les mécanismes de persistance et de protection bactérienne, notamment par la formation d'un biofilm, sont maintenant connus et étudiés. Des approches thérapeutiques qui utilisent ces nouvelles connaissances sont développées, comme l'antibiothérapie locale par SLLM ou l'instauration d'une antibiothérapie systémique qui prend en compte la concentration minimale d'éradication dans un biofilm. Ces approches, couplées à un débridement chirurgical agressif et ciblé, devraient permettre d'améliorer les taux de succès dans le traitement des cas d'OMPT les plus réfractaires. ■

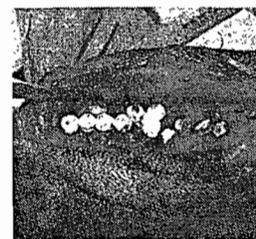


PHOTO 4. Vue peropératoire du chien qui présente une ostéomyélite de l'ulna (même animal que PHOTO 1). Des implants résorbables (non disponibles commercialement) qui contiennent une fluoroquinolone sont mis en place sur le site d'ostéomyélite.

Bibliographie

- 1 - Braden TD. Posttraumatic osteomyelitis. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 1991;21(4):781-811
- 3 - Bubenik LJ, Smith MM. Orthopaedic Infections. In: Textbook of small animal surgery. WB Saunders, Philadelphia. 2003:1862-1874.
- 6 - Dornell WS. Treatment of severe orthopedic infections. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 1999;29(5):1261-1272.
- 8 - Johnson KA. Osteomyelitis in dogs and cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1994;205(12):1882-1887.

Les références complètes de cet article sont consultables sur le site www.planete-vet.com Rubrique bibliographie

PRÉVENTION ET TRAITEMENT DES INFECTIONS OSSEUSES

Les systèmes à libération locale contrôlée d'antibiotiques

L'incorporation d'un antibiotique dans un implant-matrice déposé *in situ* permet la prévention et le traitement des infections osseuses, traumatiques ou chirurgicales.

Le concept de libération locale par élution d'antibiotiques incorporés dans un implant-matrice a été introduit en 1970 [3]. Buchholz et Englebrecht avaient alors découvert que l'incorporation de gentamicine à une matrice de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) permettait d'obtenir localement des taux très élevés d'antibiotiques, en minimisant les risques de toxicité systémique. Cette technique a été initialement utilisée à des fins prophylactiques. Des applications thérapeutiques ont toutefois rapidement été développées en médecine humaine et vétérinaire. De nombreux systèmes à libération locale résorbables sont désormais à l'étude afin de surmonter les inconvénients des systèmes non-résorbables.

► Des concentrations locales élevées

Les systèmes à libération locale contrôlée (SLLC) peuvent être divisés en trois classes : les implants matriciels (résorbables et non-résorbables), les pompes implantables et la classe des SLLC atypiques [4]. Les implants matriciels sont les plus fréquemment utilisés en orthopédie. Ces implants matriciels chargés en antibiotique sont placés directement au site infecté avant la fermeture de la plaie chirurgicale.

Le principal avantage des SLLC réside dans leur capacité à délivrer des concentrations locales d'antibiotiques très élevées (100 à 1 000 fois celles obtenues lors d'antibiothé-

rapie systémique) de manière soutenue, sans présenter de toxicité systémique (les taux sériques sont généralement très faibles) [1, 2, 5, 7, 8, 9, 15, 17, 18]. Lors d'ostéomyélites, ces présentations améliorent fortement la pénétration de l'antibiotique dans les zones dévascularisées et dans le biofilm qui recouvre un implant chirurgical. Les bactéries résistantes à des concentrations antibiotiques locales trop faibles lors d'administration systémique sont en revanche sensibles aux concentrations élevées libérées localement par un SLLC [7, 8, 14]. Le SLLC semble présenter des avantages supplémentaires : une bonne oblitération des espaces morts occasionnés par le débridement chirurgical, des propriétés d'ostéoconduction et de support mécanique pour la cicatrisation osseuse, une meilleure observance thérapeutique, une diminution de la quantité totale d'antibiotique nécessaire lors d'un traitement et la protection de molécules rapidement dégradées par une autre voie d'administration [1, 4, 8].

► Un antibiotique bactéricide et soluble

De nombreuses associations entre divers antibiotiques et matrices ont été développées. Idéalement, les antibiotiques utilisés dans les SLLC doivent être bactéricides, notamment lorsque le SLLC est à but prophylactique. Ils doivent aussi être libérés localement à des concentrations supérieures au moins dix fois la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'agent pathogène impliqué.

Ils doivent être solubles dans l'eau afin de permettre leur diffusion, ne présenter aucune toxicité locale, être minimalement absorbés dans la circulation systémique, être stables à la température de polymérisation (70 à 100° C) pour les matrices de PMMA et ne pas affecter les propriétés mécaniques de l'implant [2, 9, 15, 16, 17]. L'idéal est de choisir l'antibiotique approprié en se fondant sur les résultats des cultures bactériologiques. Lorsque cela n'est pas possible ou que le SLLC a un but prophylactique, le choix se porte sur une molécule à large spectre, active contre les germes suspectés. Les antibiotiques les plus utilisés ont été les aminoglycosides, notamment la gentamicine et la tobramycine, les céphalosporines et les fluoroquinolones [8, 9, 17].

► Des jours à des mois d'efficacité

La cinétique de libération d'un principe actif à partir d'une matrice dépend, d'une part, de la concentration, de la solubilité et du coefficient de diffusion du principe actif dans cette matrice et, d'autre part, de la géométrie (rapport volume/surface), de la porosité, de la vitesse de dégradation de la matrice et du degré de fibrose, donc de la réaction face au corps étranger, qui encapsule l'implant [2, 9, 16]. L'élution des antibiotiques est biphasique : un relargage massif survient pendant les premiers jours après l'implantation, puis celui-ci décroît progressivement [2]. Les taux locaux d'antibiotiques peuvent rester au-dessus de la CMI

d'un agent pathogène pendant quelques jours à quelques mois selon les matrices et les antibiotiques utilisés [4, 5, 8, 9, 12, 15, 16].

► PMMA comme SLLC non résorbable

Le matériau utilisé doit être inerte, non carcinogène, hypoallergénique et mécaniquement stable lors de l'élution de l'antibiotique [4]. Deux sortes de matrices sont employées : les matrices non-résorbables, qui ont été les premières utilisées, et les résorbables, qui font l'objet de vastes recherches.

Le matériau non-résorbable le plus utilisé est le PMMA. Il s'agit d'un ciment osseux obtenu par polymérisation exothermique d'une poudre polymère au contact d'un liquide monomère. Le composé durcit en dix à quatorze minutes pour former un matériau cohésif et poreux.

L'antibiotique, sous la forme de poudre ou de liquide, peut être mélangé au polymère avant la polymérisation. Ces SLLC peuvent être fabriqués extemporanément avec un antibiotique et une résine PMMA classique (SimplexP[®], Palacos[®] G, Prostalac[®]) ou être achetés prêts à utiliser (Septopal[®]), contenant de la gentamicine [14]. Les concentrations et les durées de relargage rapportées diffèrent selon l'antibiotique et le type de PMMA employés. Des études expérimentales et cliniques ont démontré que des concentrations antibiotiques bactéricides étaient maintenues dans les tissus et les fluides en périphérie des implants jusqu'à quatre-vingts jours [2, 5, 18].

Le PMMA présente néanmoins deux inconvénients majeurs : une seconde chirurgie est nécessaire pour le retrait des implants (qui peuvent agir comme un corps étranger et favoriser l'adhérence de bactéries à sa surface), et l'éluion de l'antibiotique depuis la matrice n'est jamais complète [9, 15, 17]. Ces inconvénients ont motivé le développement de matrices résorbables.

► Matrices résorbables : os, plâtre et polymères

Les matrices résorbables évitent une deuxième intervention chirurgicale pour le retrait de l'implant. La vascularisation locale est ainsi épargnée et la libération de l'antibiotique incorporé est complète.

- Lors de greffes osseuses, l'os spongieux, autogénique ou allogénique, peut être utilisé comme matrice. Il présente l'avantage de se revasculariser et d'intervenir dans les défenses immunitaires locales et la réparation osseuse [7, 12]. Une étude *in vitro* rapporte le relargage de 70 % de la charge totale en tobramycine incluse dans une greffe osseuse dans les 24 heures qui suivent son implantation. La quantité d'antibiotique détectée une semaine plus tard est négligeable [13]. Les implants d'os spongieux permettent donc une libération d'antibiotiques sur une période très courte, ce qui pourrait constituer une prophylaxie intéressante. Cette cinétique de libération n'est en revanche pas adaptée au traitement d'une infection osseuse.

- Parmi les substituts ou extenseurs de greffe osseuse [12], le plâtre de Paris est le composé qui a été le plus étudié. Ce sulfate de calcium peu coûteux présente une résorption lente (quelques semaines à quelques mois) [15]. La formulation antibiotique la plus utilisée avec ce matériau comprend 3,64 % de vancomycine et/ou 4,25 % de tobramycine [12]. Les temps d'éluion rapportés sont généralement de deux à trois semaines [13, 15].

D'après les études cliniques réalisées, ce SLLC est efficace en prophylaxie.

L'hydroxyapatite (phosphate de calcium) est un autre composé prometteur. Ses durées d'éluion et de résorption sont longues, respectivement de quatorze à quatre-vingt-dix jours et d'une dizaine de semaines [15]. Les études réalisées sur ce matériau démontrent une efficacité curative similaire au PMMA lors d'ostéomyélites expérimentales [5, 15].

- Les polymères naturels sont des éponges de collagène, de fibrine, de thrombine ou d'autres produits issus de la coagulation sanguine. Les temps d'éluion sont généralement faibles, avec un relargage en trois à quatre jours [5, 7, 9, 12, 15]. Des modifications de ces implants permettent en revanche d'allonger leurs temps d'éluion [7, 11, 15]. Les polymères naturels présentent une excellente biocompatibilité et permettent à la néoformation osseuse de remplacer graduellement le matériel implanté. Les études d'efficacité thérapeutique *in vivo* de SLLC à base de polymères naturels sont rares mais les premiers résultats sont prometteurs [7, 11, 15].

- La recherche sur les polymères synthétiques est la plus active. Les biomatériaux utilisés sont les polyanhydrides : le polyacide lactique (PLA), le polyacide glycolique (PGA), le polyacide lactique-co-glycolique (PGLA), etc. L'utilisation de ces composés permet un ajustement et un contrôle précis des différents paramètres de l'éluion. Les formulations de PLA, PGA et PGLA présentent des temps d'éluion *in vitro* et *in vivo* de trente à soixante-douze jours selon une étude réalisée avec la vancomycine, la tobramycine et la clindamycine [10]. Ils s'avèrent en outre aussi, voire plus efficaces, qu'un traitement systémique ou par SLLC à base de PMMA lors d'ostéomyélites expérimentales [6]. L'amidon et le chitosan présentent également des caractéristiques et un coût très intéressants [8].

► Efficace en prophylaxie

Les deux indications principales des SLLC sont la mise en place de prothèses articulaires cimentées (hanche et genou)

et la prévention des infections des fractures ouvertes [18]. Ces indications sont fondées sur les conclusions d'études expérimentales où l'efficacité de la prévention des infections par SLLC était équivalente ou supérieure à celle obtenue par un traitement antibiotique parentéral [2, 16, 18]. Des séries de cas cliniques ont également été rapportées en médecine humaine, dont les conclusions sont variables [17, 18]. La prophylaxie assurée par un SLLC semble toutefois au moins égale, et vraisemblablement supérieure à celle assurée par l'administration systémique d'antibiotiques.

► 80 % à 90 % d'efficacité lors d'ostéomyélite

Les SLLC sont également indiqués pour traiter des infections de prothèses articulaires et des ostéomyélites post-traumatiques. La première étude d'efficacité réalisée en 1981 avec des SLLC à base de PMMA lors de reprise chirurgicale de prothèses de hanche rapporte 77 % de succès lors de chirurgie simple et 90 % lors de révision par étapes [17]. Les études cliniques réalisées depuis ont confirmé l'intérêt des SLLC dans cette indication [18]. L'intérêt curatif de nombreux SLLC, irrésorbables et résorbables, lors d'ostéomyélite chronique post-traumatique a été démontré par des études expérimentales, puis confirmé par des rapports de cas cliniques, et des études prospectives et rétrospectives, en médecine humaine et vétérinaire [1, 2, 5, 16, 18]. Les taux de succès classiquement rapportés lors de traitement d'ostéomyélite par SLLC sont d'environ 80 à 90 %, et apparaissent similaires ou supérieurs à ceux d'une antibiothérapie systémique [1, 2, 5, 8, 11, 14, 18]. Un débridement chirurgical adéquat reste cependant nécessaire dans tous les cas.

► Intolérance locale et antibiorésistance ?

Les inconvénients liés à l'utilisation de SLLC sont rares. Ces systèmes présentent généralement une excellente biocompatibilité. Certains peuvent toutefois agir comme des corps

étrangers ou inhiber certaines composantes de la réponse immunitaire. Ces effets sont cependant modérés et se manifestent plus histologiquement que cliniquement [16, 18]. Des rapports cliniques mentionnent également la possibilité d'antibiorésistance suite à l'usage de SLLC. En effet, l'implantation de SLLC entraîne, à moyen terme, des concentrations locales et systémiques en antibiotique très basses, qui peuvent exercer une pression de sélection en faveur de souches résistantes. Cependant, très peu d'études expérimentales existent sur le sujet [8, 17, 18]. Certains sont en cours. Le coût de production des SLLC résorbables qui présentent les propriétés les plus intéressantes (composés de PLA-PLG et hydroxyapatite, entre autres) sont actuellement trop élevés pour une utilisation courante.

Les SLLC semblent présenter une efficacité au moins égale, sinon supérieure, à celle d'une antibiothérapie systémique pour la prévention et le traitement des infections osseuses, associée à un risque minimal de toxicité systémique. Le développement de matrices résorbables, notamment des polymères synthétiques, devraient apporter une réponse aux inconvénients liés à l'utilisation du PMMA. Aucun SLLC résorbable n'est toutefois actuellement disponible sur le marché humain ou vétérinaire. ■

Romain Béraud*
et Louis Hunéault*
* Faculté de médecine
vétérinaire
Chirurgie des animaux
de compagnie
J2S 2X3 St-Hyacinthe
CP 5000, Québec Canada

(1) Médicament à usage humain.



Les références
de cet article sont
consultables sur le site
www.planete-vet.com
Rubrique bibliographie

Annexe 8 : Poster présenté à la journée de la recherche (St-Hyacinthe, 20 novembre 2007)

Comparaison de la sélection de souches d'E. coli fécales résistantes lors d'administration d'enrofloxacin par un système à libération locale maîtrisée et par voie musculaire chez un modèle porc

R. Béraud*, L.M. Huneault*, D. Bernier**, F. Beaudry**, A. Letellier***, J.R.E. del Castillo**

Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, CP 5000, St-Hyacinthe, QC, Canada, J2S 7C6

*Département des Sciences Cliniques **Département de Biomédecine ***Département de Pathologie et Microbiologie

PROBLÉMATIQUE

L'antibiorésistance est un sujet d'actualité avec des implications très importantes au niveau des milieux hospitaliers humains et vétérinaires et de l'industrie agro-alimentaire.

L'ostéomyélite post-traumatique (OMPT) représente un défi thérapeutique étant donné la faible pénétration des antibiotiques systémiques au niveau des tissus dévascularisés et des biofilms présents au site d'infection^{1,2,3}.

Des systèmes à libération locale maîtrisée (SLLM) permettant d'atteindre des concentrations locales antibiotiques très élevées ont été développés pour traiter les OMPT⁴. Néanmoins, étant donné l'absorption systémique minimale des antibiotiques libérés localement⁵, les taux sériques obtenus (sous la CMI de nombreuses bactéries pendant une longue durée⁶) pourraient favoriser la sélection de bactéries résistantes au niveau de la flore commensale du patient, réservoir bactérien très important.

OBJECTIF

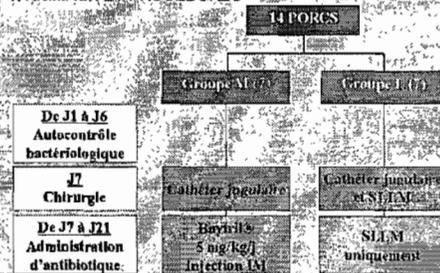
Comparer le développement de résistances bactériennes au niveau de la flore fécale d'*Escherichia coli* chez un modèle porc suite à l'administration intramusculaire (IM) et locale (SLLM) d'enrofloxacin (EFX).

HYPOTHÈSES

- Le SLLM utilisé dans ce modèle conduit à des concentrations plasmatiques d'EFX suffisamment bas pour ne pas entraîner la sélection de résistances bactériennes au niveau de la flore fécale d'E. coli étudiée.
- L'administration IM d'EFX est caractérisée par un taux de sélection de bactéries commensales résistantes supérieur à celle de la voie locale.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. ANIMAUX ET PROCÉDURES



2. ANTIBIOTIQUE

- Groupe M** : solution injectable Baytril® 100 mg/ml (Bayer, Toronto, Ont); 5 mg/kg/j IM.
- Groupe L** : implants cylindriques (L=7 mm, Ø=9 mm) de PMMA (Surgical Simplex® Radiopaque Bone Cement, Howmedica inc, Limerick, UK) contenant chacun 63 mg d'EFX (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Mise en place de 7 implants péri-fémoraux / 10 kg PV.

3. ÉVALUATIONS

Pharmacocinétique de l'enrofloxacin et de la ciprofloxacine (CFX) plasmatiques : Chromatographie liquide et spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

Bactériologie sur prélèvements fécaux quotidiens :

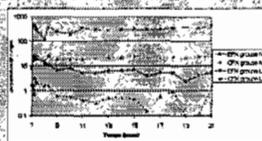
Comptage bactérien d'E. coli (CFU/g) sur gélose MacConkey (Quélab, Montréal, QC).

Sensibilité antibiotique déterminée par technique de diffusion sur disque selon les critères du Clinical and Laboratory Standards Institute pour : EFX, CFX, acide nalidixique (AcN), ceftriaxone, amoxicilline, ampicilline, streptomycine, gentamicine, apramycine, triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMS), florfenicol et tétracycline.

RÉSULTATS

1. PHARMACOCINÉTIQUE

Fig. 1 : Concentration sanguine en EFX/CFX



Les concentrations plasmatiques en EFX du groupe L représentent en moyenne 4-5 % de celles du groupe M.

Les concentrations plasmatiques en CFX représentent en moyenne 8,5% de celles d'EFX dans les deux groupes. Ses variations sont similaires à celles de l'EFX.

L'élimination d'EFX du SLLM (groupe L) est typiquement biphasique : relargage important mais bref ($t_{1/2\alpha} = 3,4 \pm 1,9$ h, $C_{max} = 26,4 \pm 2,5$ µg/L) puis relargage plus progressif durant une période prolongée ($t_{1/2\beta} = 8,76$ jours).

2. COMPTES D'E. COLI FÉCAUX

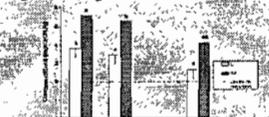
Période 1, "Contrôle" : Comptes bactériens significativement différents entre le groupe L ($6,1 \times 10^{12} \pm 2,6$ CFU/g) et M ($3,56 \times 10^{12} \pm 2,6$ CFU/g) ($p=0,019$).

Période 2, "Premier effet" : Même durée dans le groupe M ($2,4 \pm 0,5$ jours) et L ($1,7 \pm 0,2$ jours) ($p=0,17$).

Période 3, "Bactéricide" : Significativement plus longue dans le groupe M ($8 \pm 1,7$ jours) que L ($4,6 \pm 0,7$ jours) ($p=0,037$).

Période 4, "Recroissance" : Comptes bactériens statistiquement non différents des comptes de la période « Contrôle ».

Fig. 2 : Comptages bactériens d'E. coli fécaux



3. SENSIBILITÉS BACTÉRIENNES

À l'EFX

Période 2 : pas de variation significative.

Période 4 : diminution significative dans le groupe L ($p=0,05$) et M ($p<0,0001$). Les souches du groupe L sont considérées sensibles alors qu'elles sont résistantes dans le groupe M ($p<0,0001$).

Aux autres fluoroquinolones (FQ)

Variations similaires à celles de l'EFX.

Coefficient de corrélation de Pearson EFX-CFX=0,98, EFX-AcN=0,98 et CFX-AcN=0,95.

Aux autres antibiotiques

Ampicilline : diminution significative durant la période 4 vs période 1 dans le groupe M ($p<0,0005$). Coefficient de Pearson EFX-ampicilline = 0,66.

TMS : diminution significative durant la période 4 vs période 1 dans le groupe M ($p=0,0003$) et L ($p=0,041$). Durant la période 4, sensibilité supérieure des souches du groupe L vs M ($p=0,0023$). Coefficient de Pearson EFX-TMS = 0,78.

Autres : aucune variation significative.

Fig. 2 à 5, a, b, c, d : moyennes présentant des différences significatives ($p<0,05$) entre lettres différentes.

Fig. 3 : Sensibilité à l'EFX

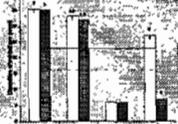


Fig. 4 : Sensibilité à l'ampicilline

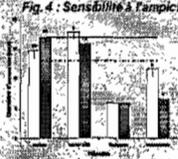
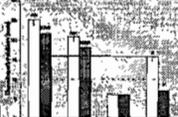


Fig. 5 : Sensibilité au TMS



DISCUSSION / CONCLUSION

- Effet significatif mais mineur de notre SLLM sur la flore intestinale : diminution temporaire des comptes d'E. coli, diminution minimale de leur sensibilité à l'EFX (en restant supérieure au seuil de résistance). Cet effet pourrait être expliqué par le bref pic de concentration plasmatique en EFX (C_{max}) proche de la CMI d'E. coli (30-125 µg/L)⁸ et l'excrétion intestinale connue des FQ via les glycoprotéines P⁹.
- Effet significatif majeur de l'administration IM sur la flore intestinale : diminution prolongée des comptes d'E. coli, sélection d'une population très résistante à l'EFX, tel que décrit par Wuiff et al¹⁰.
- Mise en évidence de résistances croisées suite à l'administration d'EFX aux autres FQ et à d'autres antibiotiques : ampicilline et TMS¹¹.

L'administration d'antibiotiques localement par SLLM semble présenter un avantage indéniable par rapport à la voie IM concernant le potentiel de sélection de souches bactériennes d'E. coli résistantes au niveau de la flore fécale. Cependant, même si les changements de sensibilité induits sont bien moindres que lors d'administration intramusculaire, ils doivent pousser le clinicien à bien justifier l'emploi de ces SLLM, notamment lors de prophylaxie où les utilisations « excessives » sont les plus fréquentes.

RÉFÉRENCES

- Waller JL, Cole M, Carlson JH. Update on the diagnosis and management of osteomyelitis. Clin Orthop Rel Res 1996; 32:191-201.
- Randall-Sapota M, Demetriades-Doukaki EL. Current insights for the local delivery of antibiotics to bone infections. Drugs 2002; 62:1223-1233.
- Shimizu H, Singer MJ, Eisenberg SC. Applications of local drug delivery systems in veterinary medicine. J Am Vet Med Assoc 2001; 219:105-108.
- Howe S, Goffinet AP. Local and systemic therapy for the management of orthopedic infections. Pharm Therapeutics 2002; 27:105-108.
- Chen H. The nature, extent, and clinical significance of antibiotic resistance. Antimicrob Chemother 2002; 51:1-7.
- Shah M et al. In vivo evaluation of gentamicin, amikacin, and ceftazidime polymyxin-bismuth emulsions against gram-negative bacteria. Vet Surg 2002; 31:215-222.
- Went C et al. The effects of oral and intramuscular bisphosphonate and dexamethasone on the inhibition of bacterial colonization, biofilm formation and cytokine response. Res Vet Clin 2002; 14:188-193.
- Walker CD. Fluoroquinolones: An alternative therapy in veterinary medicine. Vet Clin (Edinburgh) 2002; 14:194-200.
- Chen H, Wang M, Sprimont R. Fluoroquinolone (enrofloxacin) resistance by human fecal isolates. J Pharm Med 1992; 24:1587-1591.

REMERCIEMENTS

Ce projet a été financé par Santé Canada et la Fondation du XXIIe Congrès Mondial Vétérinaire. Remerciements à Guy Beaucamp, Marianne Turgeon-Pouffe, Valérie Normand et le Laboratoire d'Hygiène Vétérinaire et Alimentaire (Agriculture et Agro-alimentaire Canada, St-Hyacinthe).

Romain

De : "Val é rie Colombani" [information retirée / information withdrawn]
À : "Romain B é raud" [information retirée / information withdrawn]
Envoyé : vendredi 8 juin 2007 12:43
Objet : Re: Autorisation

Bonsoir,

Cela ne devrait pas poser de problème donc, et vous avez donc mon autorisation pour les deux articles déjà parus. Je vous joins ci-dessous mon autorisation officielle.

En revanche, pour l'article que vous nous avez soumis, je ne sais pas exactement à quel stade il en est, donc je préférerais que vous le citiez en temps qu'article à paraître (et non en le mettant en entier) si notre comité l'accepte. Cette dernière condition dépend bien entendu de la date de soutenance de votre mémoire car d'ici là l'article sera peut-être paru ?

En tant que rédacteur en chef de la revue Le Point vétérinaire, j'autorise Romain Béraud à inclure les deux articles suivants dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre "Développement de résistances bactériennes suite à l'administration d'enrofloxacin par voie orale, intramusculaire et locale chez un modèle porcin", ainsi que le microfilmage de ce mémoire :

- BERAUD R, HUNEAULT L. L'ostéomyélite post-traumatique chez le chien et le chat. Point Vet 2006 ;264 :30-35.
- BERAUD R, HUNEAULT L. Les systèmes à libération locale contrôlée. Point Vet. 2005 ;261:12-13.

Je reste à votre disposition pour toute information complémentaire,

Bien cordialement,

Valérie.

--

Valérie Colombani
Docteur vétérinaire
Rédacteur en chef Point vétérinaire/Pratique vétérinaire équine
Wolters Kluwer
Case postale 805
1, rue Eugène et Armand Peugeot
92 856 Rueil-Malmaison Cedex

Tél. [information retirée / information withdrawn]
Fax : [information retirée / information withdrawn]
Mail [information retirée / information withdrawn]

